

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios químico-físicos de la interacción de efectores
alostéricos con fosforilasa b de músculo de esqueleto de
conejo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos Gutiérrez Merino

DIRECTORES:

José Laynez Vallejo
Francisco García Blanco

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322348884

T1

544

GUT

**ESTUDIOS QUIMICO-FISICOS DE LA INTERACCION
DE EFECTORES ALOSTERICOS CON FOSFORILASA b
DE MUSCULO DE ESQUELETO DE CONEJO**

MEMORIA

para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

por

CARLOS GUTIERREZ MERINO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

BIBLIOTECA

Nº Registro30208.....

INSTITUTO DE QUIMICA-FISICA «ROCASOLANO» (C.S.I.C.)

Madrid, Mayo 1977

A Justi

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Termoquímica del Instituto de Química Física "Rocasolano", del C.S.I.C., bajo la dirección conjunta del Prof.Dr. Francisco García Blanco y del Dr. José Laynez Vallejo, a quienes expreso mi agradecimiento.

Igualmente, deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Mateo Diaz Peña por haber aceptado ser ponente de la misma así como las facilidades dadas por su Departamento para la realización de esta Tesis, al Prof. A.M. Municio por la ayuda prestada por su Departamento, al Departamento de Química Física de Superficies y Coloides, en especial a los Dres. Usobiaga y Saiz por la inestimable ayuda prestada; al Director del Instituto de Química Física "Rocasolano" por las facilidades y apoyo recibidos, y al Ministerio de Educación y Ciencia, por haber disfrutado de una beca del PFPI.

Por último a mis compañeros Margarita Menéndez, José Carlos Leyva, Gerardo Echevarria y Cristina Watt, mi mejor y más agradecido recuerdo.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION ······	1
CAPITULO I. Organización "in vivo" de la glucogenolisis	5
A) El sistema de cascada de la fosforilasa.....	5
B) Interconversión entre fosforilasa <u>b</u> y fosforilasa <u>a</u>	6
C) Actividad de la fosforilasa <u>b</u> "in vivo".....	7
CAPITULO II. Características generales de la fosforilasa <u>b</u> de musculo de esqueleto de conejo.....	9
A) Su estructura.. Propiedades físicas.. Equilibrios de asociación-disociación.....	9
Estructura primaria y modificaciones químicas...	11
B) Catálisis.....	14
CAPITULO III. Experimental.....	18
A) Materiales.....	18
B) Métodos.....	20
1. - Preparación de la Enzima.....	20
2. - Estudios cinéticos de velocidad inicial....	20
3. - Estudios cinéticos de valoración de los grupos cisteína "lentos" de la fosforilasa <u>b</u> con DTNB..	21
4. - Diálisis en el equilibrio.....	23
5. - Microcalorimetría.....	24
6. - Ultracentrifugación analítica	28
CAPITULO IV. Introducción.....	29
Conocimiento actual acerca de la acción de li- gandos sobre la fosforilasa <u>b</u>	29
Resultados	
1. - Interacción AMP-fosforilasa <u>b</u> . Acción del fosfato sobre esta interacción.....	34
2. - Acción del glucógeno sobre la fosforilasa <u>b</u> . Su efecto sobre las interacciones fosfato-enzima y AMP-enzima.....	39

3. - Efecto de la temperatura sobre la entalpía de interacción AMP-fosforilasa <u>b</u> y fosfato-fosforilasa <u>b</u>	43
4. - Análisis de las curvas multiregionales obtenidas por microcalorimetría: Resultados obtenidos con AMP.....	47
CAPITULO V. Dependencia de la interacción AMP-fosforilasa <u>b</u> y fosfato-fosforilasa <u>b</u> con la concentración de enzima.....	
Resultados.....	59
Discusión.....	60
CAPITULO VI. Especificidad estructural en la interacción AMP-fosforilasa <u>b</u>	
1. - Introducción: Conocimiento actual del tema...	76
2. - Estudios con nucleótidos análogos de AMP...	79
A) Acción de análogos de AMP activadores fuertes de la enzima.....	80
I) Resultados cinéticos.....	80
II) Resultados microcalorimétricos.....	95
B) Acción de análogos de AMP: inhibidores y activadores de la fosforilasa <u>b</u>	116
I) Resultados cinéticos.....	116
II) Resultados microcalorimétricos.....	130
DISCUSION GENERAL.....	150
I. - Introducción.....	150
II. - Generación de diferentes sitios de unión a través de estados conformacionales enzimáticos: Una formulación alostérica para explicar los resultados experimentales obtenidos con la fosforilasa <u>b</u>	152
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFIA.....	165

A B R E V I A T U R A S

AMP	- Adenosina-5'- monofosfato
ATP	- Adenosina-5'- trifosfato
AMP-2'	- Adenosina-2'- monofosfato
AMP-3'	- Adenosina-3'- monofosfato
6ClPRP	- 9- β -D-Ribofuranosil-6-cloro-purina 5' fosfato
N-1-metil AMP	
2'dAMP	- 2'-deoxiderivado de AMP
2'dIMP	- 2'-deoxiderivado de IMP
DTNB	- Acido 5,5-ditiobis-nitrobenzoico
EDTA	- Acido etilendiamino-tetraacético
N ₆ metil AMP	
G1P	- α -1-fosfato de glucosa
G6P	- Glucosa-6-fosfato
IMP	- Inosina-5'-monofosfato
NADP ⁺	- Dinucleótido de nicotinamida-adenina 2'-fosfato
P _i	- Fosfato inorgánico
PPO	- 2,5-difeniloxazol
POPOP	- 2,2'-p-fenilen-bis (5-feniloxazol)
Tris	- Tris (hidroximetil) aminometano
TNP	- NADP ⁺

I N T R O D U C C I O N

Para entender el control metabólico de un modo completo es preciso conocer los factores que regulan el flujo neto de enzimas y metabolitos a través de una ruta metabólica particular.

No obstante, cuando se habla de regulación enzimática se entiende por tal la regulación de la actividad de ciertas enzimas clave siguiendo diferentes mecanismos (1-3). La identificación de las mismas se convierte, pues, en un problema prioritario a resolver, antes de aventurar hipótesis sobre el control de una ruta metabólica.

A partir de la obtención "in vitro" de curvas de saturación por el sustrato o de activación o inhibición por diferentes metabolitos suele atribuirse a ciertas enzimas un carácter regulador. Sin embargo esta manera de proceder es imprudente por dos razones:

a) El limitado número de efectores potenciales utilizados en los experimentos "in vitro" respecto al presente en la célula.

b) Frecuentemente, la concentración de efector a la que se observa "in vitro" el efecto regulador difiere de la encontrada "in vivo".

Por otra parte, suele considerarse que las enzimas que catalizan reacciones en las que las concentraciones de sus sustratos y productos "in vivo" no sean las de equilibrio (enzimas denominadas de no-equilibrio) son reguladoras. Sin embargo, en ciertas condiciones, procesos que se hallan próximos a su posición de equilibrio también pueden ser regulados. Esta objeción limita, pues, la validez de la generalización anterior.

El problema se centra así en la determinación de todos los factores que "in vivo" afectan a la actividad de un sistema enzimático, para poder concluir su operatividad regulatoria "in vivo".

Una de las denominadas "enzimas reguladoras" comúnmente conocida es la fosforilasa b de glucógeno (E.C.2.4.1.1.)

Aunque extensamente estudiada (4-6) la fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, presenta aún muchos problemas por resolver. Así, no se conoce el mecanismo catalítico ni el papel exacto que en él desempeña el AMP, activador alostérico de esta enzima (7).

Por otra parte, esta enzima es muy adecuada para un estudio profundo de los fenómenos alostéricos ya que presenta interacciones homotrópicas y heterotrópicas (5) y además es asequible en relativamente grandes cantidades, lo cual permite llevar a cabo estudios químico-físicos inabordables actualmente para la mayoría de las proteínas.

El estudio de la relación entre estructura y función catalítica presenta gran interés al haberse demostrado (8-11) que su comportamiento no puede ser descrito exactamente en términos del modelo concertado (12) ni del modelo secuencial (13-15).

El reciente descubrimiento de la existencia de dos clases de sitios de diferente afinidad hacia AMP (16-18) plantea la cuestión de la significación de cada una de estas clases de sitios, problema que, como se verá a lo largo del análisis y discusión de los resultados expuestos en este trabajo, resulta hallarse muy relacionado con el estado de agregación enzimático (dímero o tetrámero) más activo catalíticamente (1,2).

Este trabajo se ha desarrollado en torno a un eje central: el estudio de la acción de AMP sobre la fosforilasa b.

Dada la complejidad del problema abordado se ha considerado preciso recurrir al estudio del mismo utilizando diversas técnicas químico-físicas. Los resultados que se obtienen por las diferentes técnicas no coinciden exactamente y a veces es imposible correlacionarlos cuantitativamente, lo cual ha hecho que estas discrepancias hayan sido cuidadosamente analizadas. La principal razón de ser de estas discrepancias estriba en las diferentes condiciones experimentales, en las diferentes técnicas, de la disolución de enzima (presencia o ausencia de ciertos efectores y concen-

tración de enzima, fundamentalmente) que afectan enormemente las constantes y propiedades químico-físicas del sistema ligando-fosforilasa b, como las constantes de unión, de cambio transconformacional, entalpías de interacción, etc.

En completo paralelismo con los hechos mencionados, una de las más importantes premisas de este estudio, plenamente confirmada por los resultados obtenidos, es la consideración del sistema enzimático, no como un ente aislado en disolución, sino como parte integrante e integrada de la misma. La sistematización de las propiedades del sistema "disolución de enzima" en un tampón, se convierte en la primordial tarea químico-física para comprender su comportamiento.

=====

CAPITULO I

C A P I T U L O I

ORGANIZACION "IN VIVO" DE LA GLUCOGENOLISIS

A) El sistema de cascada de la fosforilasa

La fosforilasa b cataliza la reacción



El equilibrio está favorecido en el sentido de la síntesis del polisacárido (4/1). Sin embargo, el bajo nivel de glucosa-1-fosfato por acción de la fosfoglucomutasa (la relación de concentraciones de equilibrio de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato es 17/1) y la alta concentración de fosfato determinan que la reacción catalizada por la fosforilasa "in vivo" transcurra en el sentido de degradación del glucógeno, siendo la glucógeno sintetasa, en estas condiciones, la encargada de realizar la síntesis (19).

Normalmente, en el músculo en reposo, la fosforilasa se supone en su forma b. Su transformación en fosforilasa a implica la fosforilación de la fosforilasa b por la fosforilasa b quinasa utilizando ATP como donador de fosfato. Puesto que la enzima que cataliza la fosforilación de la fosforilasa b es la quinasa (quinasa-quinasa) que se activa por AMP cíclico, el sistema se halla sujeto al control hormonal

a través de la adrenalina y de la adenil ciclasa. Otras posibilidades de control de este sistema enzimático son factibles porque ambas, fosforilasa b quinasa y fosforilasa b son dependientes del ión Ca^{++} (6), que a su vez es un importante elemento de control en la utilización de glucógeno durante la contracción muscular, ya que relaciona la actividad glucogenolítica con el sistema nervioso (Fig.1) (20).

B) Interconversión entre fosforilasa b y fosforilasa a

En el músculo de esqueleto la conversión de la fosforilasa b en a parece ser la responsable de la iniciación de la degradación del glucógeno (21) habiéndose demostrado recientemente que es la enzima limitante in vivo, en *E. Coli* (22).

En el músculo en reposo se convierte la glucosa en glucógeno y puesto que la concentración de ATP es alta, y la de AMP baja, la fosforolisis del glucógeno es mínima (21). La contracción muscular, al utilizar ATP, y producir AMP, invierte estas relaciones. La glucosa-6-fosfato disponible interviene en el proceso glicolítico, que finalmente lleva a la síntesis de ATP, y se verifica una demanda de producción, a partir del glucógeno, de glucosa-6-fosfato adicional para esta función. El incremento de la concentración de AMP, la disminución de la concentración de ATP, y la disminución de la concentración de glucosa-6-fosfato, permiten actuar a la fosforilasa b. Simultáneamente, la epinefrina induce a la formación de AMP cíclico, que activa a la fosforilasa b quinasa elevando los niveles de fosforilasa a y po-

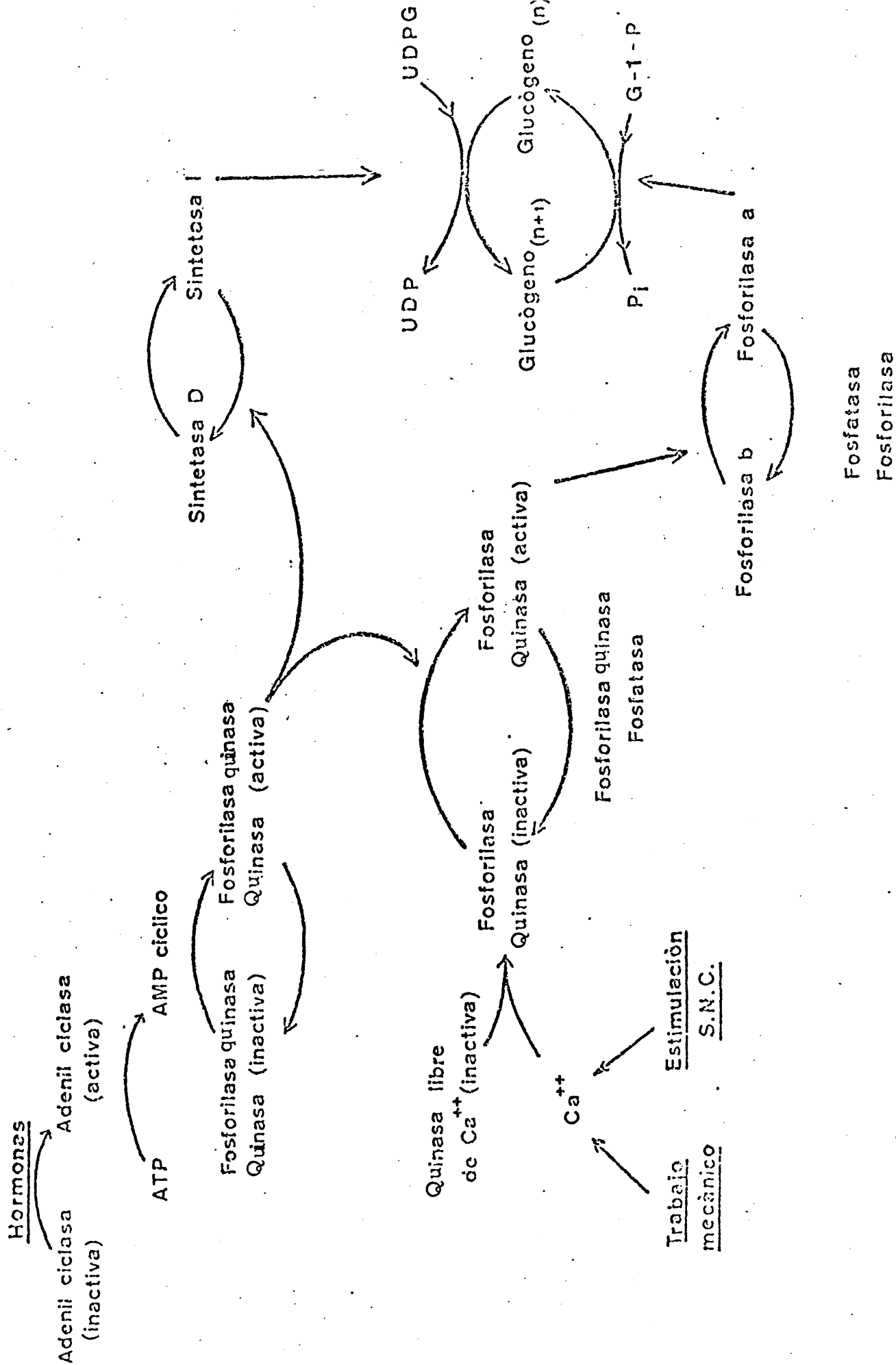


FIGURA 1

tenciando, por consiguiente, la fosforolisis del glucógeno (21). La glucogenolisis se ve, además, favorecida por la inactivación de la sintetasa paralela frente a la activación de la fosforilasa. Muy recientemente ha sido demostrado que la interrelación entre la actividad de la glucógeno sintetasa y de la fosforilasa es aún mayor en hígado de conejo, donde una misma fosfatasa defosforila "in vivo", a la fosforilasa a y a la glucógeno sintetasa fosforilada (23).

Por otra parte, es interesante constatar aquí que algunos de los sitios específicos hacia AMP en la fosforilasa actúan de dos maneras en el control de la actividad enzimática: directamente, en la modulación de la actividad de la fosforilasa b e indirectamente, en la regulación de la modificación covalente de la enzima (24,25).

C) Actividad de la fosforilasa b "in vivo"

La activación de la fosforilasa b "in vivo", por AMP se ha puesto de manifiesto en los siguientes casos:

- 1 - Funcionamiento del músculo de corazón de rata en condiciones anaerobias (26-36).
- 2 - En la contracción muscular de una variedad de rata ("I strain mice") (37) con deficiente actividad de fosforilasa b quinasa.

El músculo en reposo contiene numerosos efectores de la fosforilasa b : los inhibidores ADP, ATP, glucosa-6-fosfato y UDEPG y el activador AMP, predominando el efecto inhibidor de los tres primeros (38). El ejercicio muscular

altera sensiblemente los niveles de los metabolitos citados, siendo la glucosa-6-fosfato el principal inhibidor de la fosforilasa "in vivo".

En el músculo activo, si la fosforilasa permaneciera en su forma b se produciría un incremento en su actividad por acción del AMP, debido a un incremento relativo de la concentración de AMP respecto de los otros nucleótidos de adenina (39). Sin embargo, recientes cálculos indican que sólo un (10-14%) de la fosforilasa total presente en el músculo se activa por esta vía (6).

CAPITULO II

C A P I T U L O I I

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA FOSFORILASA b DE MUSCULO DE ESQUELETO DE CONEJO.

El aislamiento y cristalización de la fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo se debe a Corí y col. (40). Posteriormente se han descrito modificaciones del mismo (41,42).

A) Su estructura

A₁) Propiedades físicas. Equilibrios de asociación-disociación.

Hoy se acepta para la fosforilasa b un peso molecular de $(1.8 - 1.9) \times 10^5$ daltons (5) que corresponde a un estado dimérico.

En condiciones disociantes, el peso molecular obtenido es de $(9.25 - 9.80) \times 10^4$ daltons, que se toma como el peso de cada monómero (43).

El dímero es la forma de la fosforilasa b fisiológicamente más abundante y, aparentemente, la más activa (5, 43).

Por microscopía electrónica se ha podido concluir que el dímero consta de dos unidades elipsoidales unidas y que el tetrámero de ambas fosforilasas se halla formado por

la asociación simétrica de dos dímeros poseyendo una forma rómbica (5). Valentine y Chignell (44) sugirieron que los monómeros no son idénticos en su acción estructural, asignándoles sitios de unión responsables de unir las subunidades en el dímero y sitios implicados en el equilibrio dímero-tetrámero o de interacción interdímeros.

El fácil desplazamiento de la forma tetrámera a dímera indica una interacción de los sitios β - β' muy débil mientras que la obtención de monómero implica condiciones altamente disociantes y por consiguiente una fuerte interacción (α - α').

Los resultados obtenidos a 3\AA de resolución para la estructura cristalina de la fosforilasa a y b, y los obtenidos con 6\AA para la fosforilasa en presencia de ligandos (45-49) concuerdan con las conclusiones obtenidas a partir de resultados de RMN y RSE (6).

Estudios de dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular indican que ambas formas de la fosforilasa, a y b, presentan un contenido muy similar de α -hélice, no alterándose apreciablemente ($<5\%$ del total) la cantidad de estructura ordenada (5).

Los entornos de los cromóforos aromáticos son similares, aunque no idénticos, en ambas formas (50) puesto que a 280 nm . el coeficiente de extinción de la fosforilasa a es aproximadamente un 1% mayor que el de la fosforilasa b.

No obstante, entre ambas formas de la fosforilasa,

existen diferencias conformacionales importantes que pueden resumirse en:

- Alteración de la estructura terciaria de la proteína para permitir la actividad catalítica en ausencia de AMP.
- Estabilización del estado tetramero.
- Disminución en la solubilidad y estabilidad a la desnaturalización por frío (5).

La fosforilasa b se encuentra en equilibrio entre especies diméricas y tetraméricas. Su activador alostérico, AMP, desplaza el equilibrio hacia el tetramero, que se ve favorecido por Mg^{++} , F^- , poliaminas, fosfato y glucosa-1-fosfato (51).

En determinadas condiciones es posible formar especies monómeras de la fosforilasa b. Así un tratamiento prolongado con reactivos específicos de grupos -SH, como DTNB o p-mercuribenzoato; reducción del enlace enzima piridoxal-5'fosfato; resolución de la enzima (formación de la apoenzima) y tratamiento con ATP disocian la enzima. La especie monomérica es catalíticamente activa, exhibiendo una actividad de un 30% respecto de la enzima dimérica (5,52).

A₂) Estructura primaria y modificaciones químicas.

El monómero de fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo consta aproximadamente de 800 aminoácidos, oscilando alrededor de este número en las distintas fosforilasas estudiadas (5).

Sólo el aminoácido C-terminal de la fosforilasa de rata es conocido (11e). El grupo N-terminal de la fosforilasa de músculo de conejo se ha identificado muy recientemente, debido a que se halla acetilado (53). Por otra parte todavía no se conoce la estructura primaria completa de la fosforilasa b, no obstante para la de músculo de esqueleto de conejo se conocen fragmentos aislados (5,53,54).

Por digestión tripsica controlada se obtienen dos derivados de la fosforilasa b activos catalíticamente, b_t y $b_{t'}$ (55). La modificación química de la fosforilasa b con NaBH_4 y aldehidos alifáticos (56) permite obtener derivados de la fosforilasa con mayor resistencia contra la inactivación por calor y frío.

Las modificaciones químicas de la enzima por alquilación reductora con aldehidos alifáticos (5,57), por tratamiento con peróxido de hidrógeno (58) o por digestión tripsica (55) alteran las propiedades alostéricas de la activación de la enzima por AMP.

Compuestos aromáticos se fijan (59) e inhiben (60) a la fosforilasa b, alterando las características de cooperatividad homotrópica de la unión de AMP y glucosa-1-fosfato a la enzima.

Estudios cinéticos en función del pH han permitido concluir que un grupo con pK_a aproximadamente igual a 6.2 es importante para la unión de los sustratos y para la catálisis (61). Este grupo podría ser el grupo fosfato de

la coenzima, un grupo histidina o bien un grupo carboxilo en un entorno hidrofóbico. Recientes resultados parecen confirmar esta última hipótesis (62).

Atendiendo a la distinta reactividad con agentes tiólicicos, los grupos cisteína de la fosforilasa b (63,64) se dividen en tres clases: dos de ellos (por monómero) se hallan expuestos en la superficie y su alquilación produce un efecto despreciable en la actividad y estructura cuaternaria de la enzima. Otros dos grupos -SH (lentos) por monómero se valoran por reacción con DTNB en el rango de los minutos (65) y su reacción con iodoacetamina produce una parcial inactivación y monomerización de la enzima. Finalmente hay una tercera clase de grupos -SH que sólo reaccionan con iodoacetamida cuando la fosforilasa b está desnaturalizada. El número total de -SH por monómero es 9, (66).

Los derivados de la fosforilasa b obtenidos por tratamiento con DTNB y FDNB exhiben una marcada reducción en las interacciones intersitios, homotrópicas y heterotrópicas (58,67) que se atribuyen a la modificación de algún residuo cisteína o lisina.

El grupo ϵ -amino de una lisina proporciona un fuerte punto de unión de la coenzima a la fosforilasa b (5). Por otra parte, en dos artículos recientemente publicados se muestra la importancia de las tirosinas (68) y triptófanos (69) en la unión del activador alostérico,

AMP, a la fosforilasa b.

B) Catálisis

Puesto que la molécula de glucógeno es a la vez reactivo y producto, la constante de equilibrio de la reacción está determinada por la relación de ortofosfato a glucosa-1-fosfato. Dado que ésta es un ácido más fuerte que el ortofosfato, el valor de la relación entre ambos será función del pH. A pH = 6.8 la constante de equilibrio tiene un valor próximo a la unidad, lo cual concuerda con la fácil reversibilidad de la reacción (21).

La fosforilasa ataca a la molécula de glucógeno desde el extremo no reducido de cada cadena, liberando restos de glucosa en forma de glucosa-1-fosfato hasta que quedan unos cuatro restos de glucosa en cada rama antes del punto de bifurcación, momento en que la actividad cesa (21).

Cualquier hipótesis concerniente al mecanismo de la reacción catalizada por la fosforilasa debe explicar los tres hechos experimentales siguientes: (a) no hay intercambio isotópico entre glucosa-1-fosfato y fosfato inorgánico marcado en presencia de enzima (70); la α -configuración de la glucosa se conserva en la reacción de fosforolisis, si bien la sustitución ocurre en el átomo de carbono asimétrico (71); (c) el efecto secundario isotópico es aproximadamente despreciable (72).

Se han propuesto dos mecanismos posibles para la

reacción. Koshland (73) propuso un mecanismo de doble desplazamiento en el C-1 de la glucosa, para la síntesis de glucógeno. Supone la formación de un compuesto intermedio de la enzima con el residuo de glucosa, durante el primer paso del proceso y la transferencia posterior de la glucosa desde la fosforilasa al extremo de la cadena de glucógeno. Durante el proceso tiene lugar dos veces la inversión de Walden en el mismo átomo de carbono y, en consecuencia, se conserva la configuración inicial de la glucosa. Este mecanismo se adapta bien a los requerimientos anteriores, si se considera que el complejo intermedio enzima-glucosa no puede formarse en ausencia del segundo sustrato, glucógeno (72). Estudios cinéticos prueban que un intermedio ternario, al que se llega por mecanismo "random", es el paso limitante de la velocidad de reacción (74).

El otro mecanismo propuesto por Kosower (75), sugiere que el paso limitante de la velocidad de reacción consiste en la ruptura del enlace $C(1) - O$, con la formación de un par iónico interno (un catión glucopiranosil carbonio y un anión enzima). Esta hipótesis no es consistente con la ausencia de un efecto secundario isotópico marcado, pero explica la inhibición de la fosforilasa por 1,5-gluconolactona (76) ya que este compuesto puede ser análogo de un posible estado intermedio con formación de catión carbonio.

Por otra parte la enzima es altamente específica hacia el azúcar, ya que sólo la α -D-glucosa reacciona en la transferencia de un residuo glicosídico, pudiendo ser sustituido el fosfato por arsenato en la degradación pero no en la síntesis de glucógeno (5). El polisacárido sustrato inicial de la fosforilasa se llama "primer" (en el sentido de síntesis de glucógeno), dependiendo la capacidad para ser primer de un polisacárido de la procedencia de la enzima.

Ambas formas de la fosforilasa de todas las especies estudiadas precisan para su actividad de la vitamina B₆ o piridoxal-5'-fosfato, que es su coenzima. Sin embargo su papel exacto no es aún perfectamente conocido, aunque sí su unión a la enzima (77-81). Se postulan tres hipótesis para su modo de acción: a) Se halla involucrado directamente en el proceso catalítico; b) puede servir para proporcionar una cierta flexibilidad conformacional a la enzima, precisa para la reacción con el polisacárido y c) se trata de una combinación de ambas hipótesis (5).

La resolución de la fosforilasa b, proceso por el que se obtiene la apoenzima, produce graves alteraciones en la estructura secundaria de la proteína (82) y la disociación de la enzima en sus subunidades (83). La apoenzima no presenta actividad catalítica apreciable y es menos estable que la holoenzima.

Resultados recientes (84) han demostrado que el

sustrato (glucosa-1-fosfato) y AMP causan un cambio conformacional que cierra el entorno hidrofóbico en el que se halla la coenzima, por el contrario los inhibidores lo abren. Por tanto, el anillo de piridoxal-5'-fosfato no ha de participar directamente en el mecanismo catalítico aunque el grupo fosfato que sale del entorno hidrofóbico sí es accesible y permite explicar la transferencia de energía entre éste y otros sitios de la fosforilasa (78).

CAPITULO III

C A P I T U L O I I I

E X P E R I M E N T A L

A) Materiales

Tampón gly-gly : El tampón utilizado a lo largo de todo el estudio ha sido el siguiente: glicilglicina ($5 \times 10^{-2}M$) , ClK ($5 \times 10^{-2}M$) y EDTA ($10^{-4}M$) pH = 6.9.

La glicilglicina fue suministrada por las casas J.T.Baker y SIGMA.

Tampón Tris-acetato . Se prepara disolviendo la cantidad necesaria de tris en agua destilada y ajustando posteriormente el pH a 7 con ácido acético. El tris utilizado fue de la casa SIGMA (Trizma base).

Disoluciones. Las disoluciones de DTNB se preparan en tampón gly-gly. La disolución se lleva a pH = 6.9 con Tris (0.5M).

Se denomina medio de dosaje al medio de reacción que se utiliza para las medidas de actividad enzimática. Su composición es la siguiente:

Glucógeno. Concentración final de $2,5 \times 10^{-3}M$ en restos de glucosa, excepto en aquellos casos en que expresamente se

indique lo contrario.

Fosfato monopotásico en la concentración final que en cada caso se señale (Merck).

Acetato de magnesio, $10^{-2}M$ final (Merck)

NADP+, concentración de 0,5 mg/ml, en todos los ensayos cinéticos realizados (SIGMA).

Tampón gly-gly en la cantidad precisa para completar el volumen final deseado.

Líquido de centelleo (Bray) . Su composición es la siguiente:

Naftaleno	60 g.
PPO	4 g.
POPOP	0,2 g.
Metanol (absoluto)	100 ml.
Etilen-glicol	20 ml.
p-Dioxano	hasta un litro

Los productos utilizados fueron de la máxima pureza recomendados para centelleo líquido (Merck).

Los diferentes nucleótidos fueron suministrados indistintamente por Terra-Marine Bioresearch, PL-Biochemicals, Merck, Serva y Sigma. Su pureza se comprobó por cromatografía en capa fina en PEI celulosa. Para su utilización sus disoluciones se prepararon siempre en tampón gly-gly a pH = 6.9.

B) Métodos

1 - Preparación de la enzima.

El método seguido para la obtención de esta enzima es el de Krebs y col. (42), con pequeñas variantes (85).

Para su uso diario la enzima cristalizada tres veces se redisuelve en tampón gly-gly y se pasa por una columna de Sephadex G-25, equilibrada en el mismo tampón, tratándose a continuación las fracciones de enzima eluida con carbón activo para eliminar completamente el AMP.

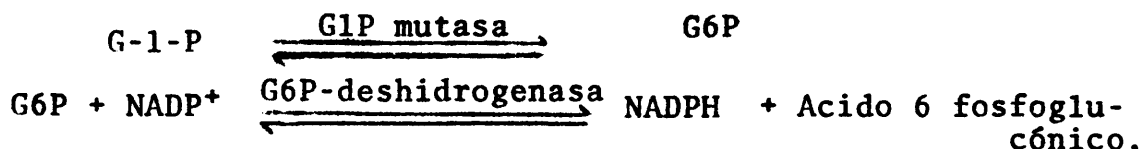
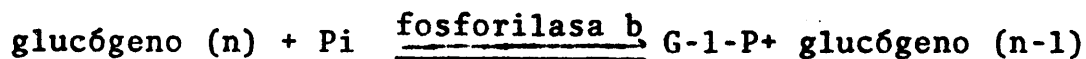
Si la relación de absorbancias a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) de la enzima estaba entre 0.52 - 0.53, la enzima se halla en perfectas condiciones de pureza (43).

La concentración de enzima se determinaba midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción:

$$A_{\substack{280 \\ 1 \text{ cm.}}} = 1.32 \frac{\text{D.O.}}{\text{cm. paso óptico} \times (\text{mg/ml})} \quad \text{a pH } = 6.9 \text{ y } 28^{\circ}\text{C.}$$

2. Estudios cinéticos de velocidad inicial

En el presente trabajo se ha utilizado la reacción en el sentido de degradación del glucógeno según el procedimiento descrito por Helmrich y Cori (86) basado en el acoplamiento de tres reacciones enzimáticas



El último equilibrio en el que se halla implicada la G-6-P deshidrogenasa, se desplaza fuertemente hacia la derecha colocando una elevada concentración de NADP^+ en el medio de reacción, siguiéndose ésta por la variación de absorbancia a 340 nm. característica del NADPH.

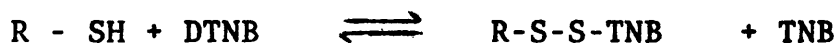
En el caso de inhibidores de la actividad enzimática se toma como nivel 100% el valor de la actividad residual de la fosforilasa b. Para los activadores los porcentajes de activación se han reducido a la activación producida por $\text{AMP } 10^{-3}\text{M}$ (activación máxima de AMP a 25°C 130 DO/m. x mg. Los valores de $K_{1/2}$ de inhibición o activación son las concentraciones de efector necesarias para que la inhibición o activación sea la mitad de la máxima inducida por cada efector.

3. Estudios cinéticos de valoración de los grupos cisteína "lentos" de la fosforilasa b con DTNB.

La manera en que los diferentes nucleótidos afectan a la reactividad de las cisteínas con DTNB ha sido el objetivo preferente de este estudio.

La reacción entre DTNB y la fosforilasa b se basa en la fijación de este disulfuro a los grupos sulfhidrilos

formando un disulfuro mixto y liberando un anión coloreado, el 4-nitro-5-carboxitiofenolato (TNB) :



La cinética de aparición de este anión se puede seguir espectrofotométricamente (87), a 430 nm. debido a la absorción del TNB. El incremento de absorbancia correspondiente a la valoración completa de un -SH de la fosforilasa b a una concentración de 1 mg/ml a 430 nm y pH = 7,0 se ha estimado en 0,136 D.O.

Las primeras medidas cinéticas de valoración de los -SH lentos de esta enzima por DTNB fueron efectuadas por Kleppe y Damjanovich (65) y posteriormente por Buc y col. (66, 88)

En concordancia con los resultados obtenidos por Buc y col. (88) se observó una variación de las constantes de velocidad de valoración de los grupos -SH lentos en función del tiempo de incubación del efector con la enzima. Estas constantes se estabilizan para tiempos de incubación superiores a los 8 min. Por esta razón se ha incubado siempre 10 min. el efector con la enzima antes de añadir el reactivo DTNB.

Puesto que las dos "cisteínas lentas" reaccionan con DTNB, independientemente una de la otra, siguiendo cinéticas de primer orden, pueden obtenerse las constantes de velocidad de reacción (K_1 y K_2), (110).

4. Diálisis en el equilibrio

Se ha seguido el método descrito por Colowick y Womack (89) y Ridlington (90). Estudiándose el desplazamiento de AMP-C¹⁴ por AMP frío o por los otros nucleótidos utilizados. Los experimentos se realizaron a (25.0 ± 0,2)°C. Pudo observarse que la enzima durante la primera semana después de su obtención era resistente al tratamiento y conservaba completamente su actividad. La concentración de producto radiactivo utilizada osciló entre 10⁻⁸ y 10⁻⁷ M. De este modo, éste se halla presente en trazas, es decir, a una concentración despreciable ante la concentración de efector frío y respecto a su K_m. La concentración de enzima se mantuvo entre (5-10) x 10⁻⁵M (monómero) del mismo orden que la utilizada en los experimentos microcalorimétricos y de ultracentrifugación analítica. Se barrió la concentración de efector frío en el rango comprendido entre 10⁻⁵ y 10⁻²M.

Una vez alcanzado el equilibrio se pipetea una cantidad fija de cada compartimento de las diferentes células, que se introduce en los viales junto a 8 ml. de líquido de centelleo "Bray". El aparato utilizado fue un nuclear Chicago, el tiempo de conteo fue de 10 min. por vial, obteniéndose un número de cuentas entre 30.000 y 70.000, según la radiactividad del efector marcado utilizado.

Los productos radiactivos utilizados fueron suministrados por Amersham.

5 -- Microcalorimetría

Los microcalorímetros utilizados en este estudio: LKB "batch" y LKB de flujo, son de conducción térmica y se basan en el principio de los calorímetros gemelos (91,92). La principal diferencia entre ellos estriba en la forma de mezclar las sustancias reaccionantes. El primero de estos microcalorímetros es particularmente apto para el estudio de reacciones lentas, en tanto que el segundo es más apropiado para reacciones rápidas.

La técnica experimental, si bien es similar en ambos casos, difiere según el tipo de microcalorímetro.

A) Microcalorímetro de "batch" . Se ha reproducido esquemáticamente en la fig. 2. Consta de dos recipientes de reacción gemelos (denominados células de reacción), cuatro termopilas, un bloque de aluminio rodeado de una capa de plástico aislante e inmerso en un baño de aire termostatzado, un amplificador y un registro gráfico con integrador incorporado (91). El aparato descrito es un microcalorímetro diferencial de conducción y la reacción tiene lugar en una sola de las células gemelas (fig.3). El calor de reacción se transmite al bloque de aluminio a través de las termopilas, por efecto Seebeck, se produce una diferencia de potencial que se amplifica y se registra en función del tiempo. El área de la curva voltaje-tiempo es proporcional al calor de reacción (fig.4).

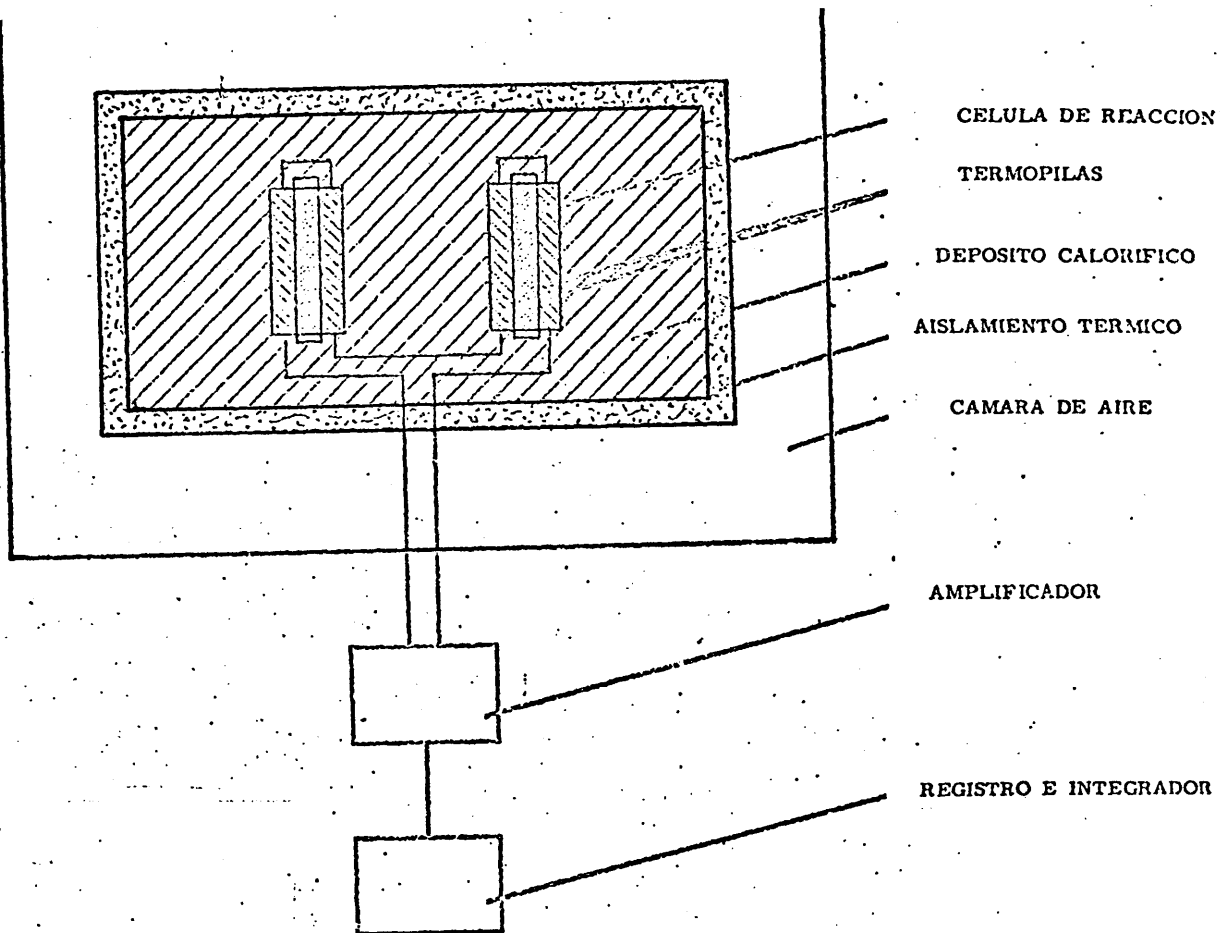


Fig. 2.- Esquema del calorímetro LKB batch

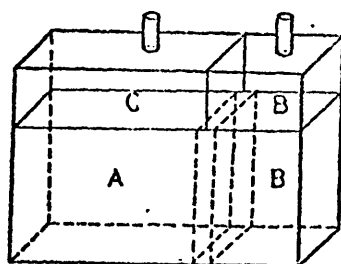


Fig. 3.- Célula calorimétrica

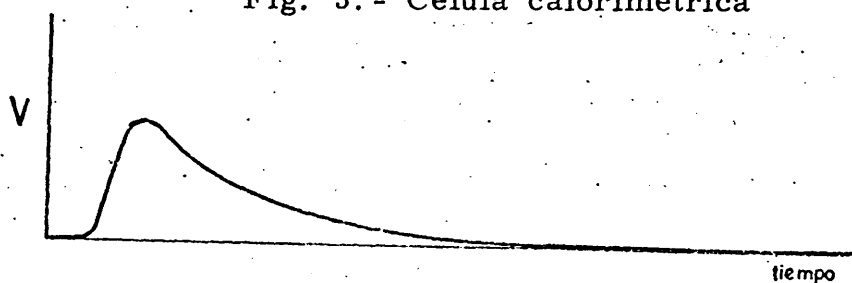


Fig. 4.- Registro gráfico, potencial-tiempo, calorímetro batch

Las células de reacción, fabricadas en oro, tienen forma rectangular, con unas dimensiones aproximadas de 4 x 3 x 1 cm. (fig.3). Se hallan divididas en dos compartimentos A y B, en donde se introducen las sustancias reaccionantes, las cuales se comunican por la parte superior (C y D).

El aparato se calibra eléctricamente suministrando al calorímetro una cantidad medida de energía eléctrica mediante un circuito de calibrado eléctrico que lleva incorporado el aparato y que consta de una fuente de voltaje constante, un reloj electrónico - con una precisión de ± 0.01 sg., una resistencia patrón de 100Ω , una resistencia de calefacción de 50Ω y un potenciómetro. Puede calibrarse también mediante una reacción standard, usualmente de neutralización ácido-base ($\text{ClH}-\text{NaOH}$). La constante de calibrado, ϵ , es el factor de proporcionalidad entre el calor suministrado eléctricamente o el producido en la reacción de calibrado, Q , y el área, α , de la curva voltaje-tiempo del registro gráfico $\epsilon = \frac{a}{\alpha}$. En la fig.4 se muestra una curva típica potencial-tiempo para una reacción instantánea o muy rápida.

La sensibilidad del aparato permite medir calores del orden de 0,9 milicalorías con un error máximo del 0,8%, siendo la precisión de un 0,3% para calores del orden de 0,01 calorías. Este microcalorímetro fue el utilizado para

todos los experimentos realizados a 25°C descritos en este trabajo.

En los experimentos realizados en este estudio se introdujeron las sustancias reaccionantes en una de las células de reacción y utilizando la otra célula de reacción se compensó automáticamente el calor de dilución del o de los agentes interaccionantes con la enzima (fosfato, nucleótidos y glucógeno). El calor de dilución de la enzima desde 4 a 2,67 mg/ml, desde 4,5 a 3,0 mg/ml y desde 1,5 a 1,0 mg/ml fue evaluado en experimentos independientes. En los casos citados el calor de dilución osciló entre 0,1 y 0,2 milicalorías, valor despreciable frente a los calores de interacción medidos de la enzima con los nucleótidos y/o sustratos.

Una vez introducidos los reactantes en las células de reacción se ha de esperar, para realizar la reacción, hasta alcanzar el equilibrio térmico en el interior del bloque del calorímetro. Dada la alta sensibilidad a que se trabajó en este estudio, el tiempo de estabilización del aparato para cada medida fue del orden de una hora e incluso superior. Por esta razón se comprobó la estabilidad de la enzima en estas condiciones. Se incubaron con este fin muestras de enzima a 25°C, hasta tres horas en el aparato, muestras a las que se midió su actividad catalítica después de tal incubación. Durante la primera semana después de obtenida, la enzima es estable a este tratamiento y los valores entálpicos son reproducibles, por esta causa todos

los experimentos microcalorimétricos comunicados aquí se han realizado en este período de tiempo.

B) Microcalorímetro de flujo. En este aparato las sustancias reaccionantes entran en el calorímetro por dos conductos independientes, A y B, impulsadas por dos bombas peristálticas, mezclándose en la célula de reacción, de forma laberíntica y saliendo finalmente al exterior (fig.54) (92,93).

Manteniendo la velocidad de bombeo fija se produce un flujo de calor constante con el transcurso de la reacción química, que provoca una diferencia de potencial que se amplifica y registra gráficamente (véase la fig.6). La altura del salto registrado es proporcional al calor producido por unidad de tiempo. El aparato se calibra de igual modo que el microcalorímetro de batch y se determina la constante de proporcionalidad, ϵ , en (unidad de calor) x cm⁻¹ x sg.⁻¹ (92).

En experimentos independientes se han de determinar los calores de dilución de las distintas sustancias reaccionantes con los que se corrige el calor total del proceso y se obtiene el calor de la interacción efector-enzima. El calor de dilución de la enzima (5,2 a 2,6 mg/ml) se encontró despreciable frente a las demás contribuciones caloríficas del sistema en todos los casos y dentro del error experimental de medida.

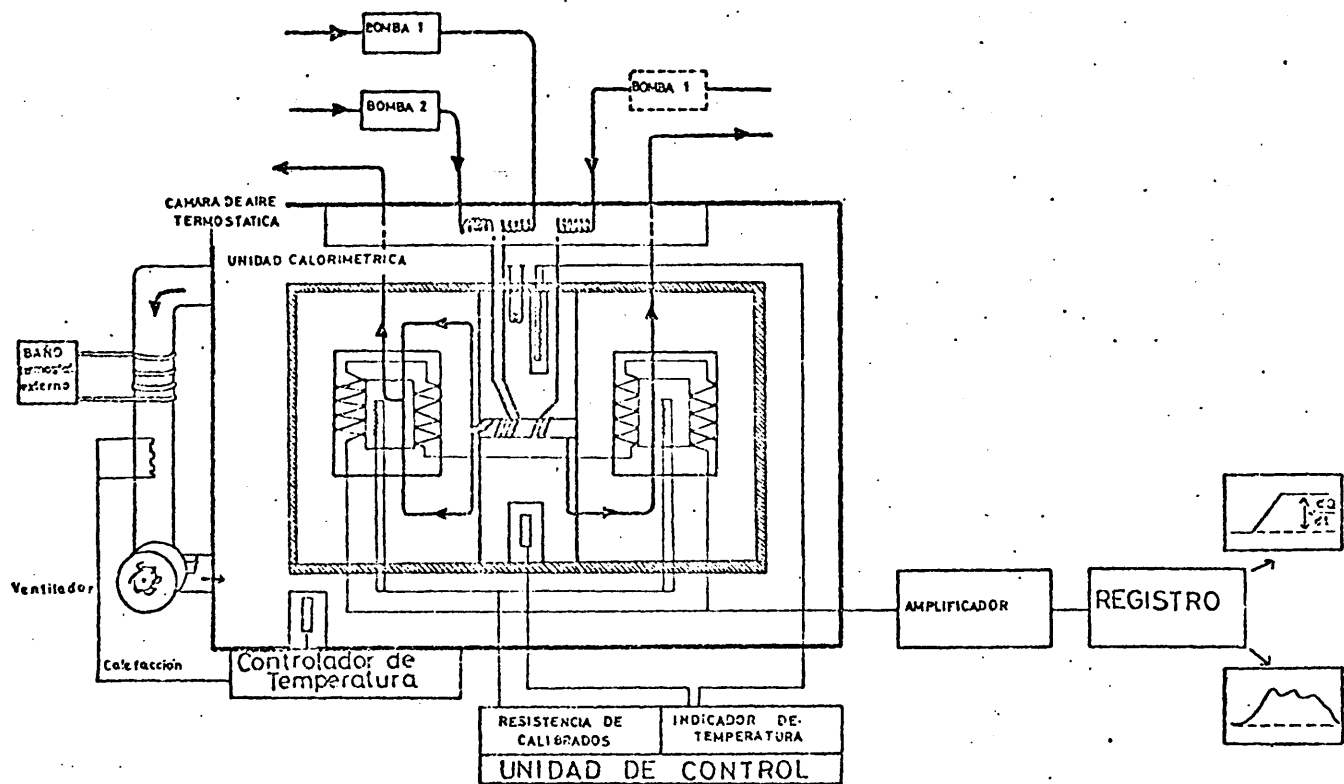


Fig. 5. - Esquema del calorímetro de flujo

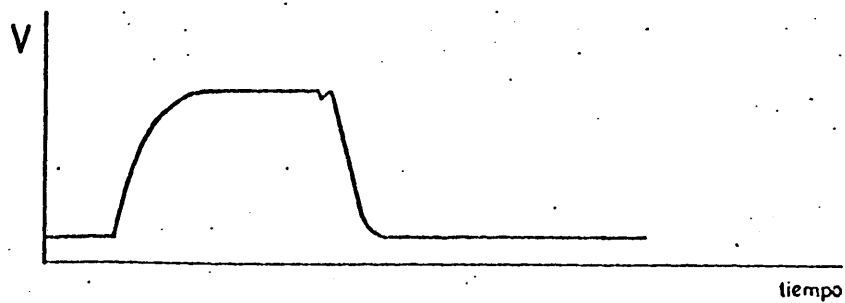


Fig. 6. - Registro gráfico, potencial-tiempo, calorímetro de flujo

Con este aparato se han realizado en este trabajo los experimentos descritos a temperaturas diferentes a 25°C.

6. Ultracentrifugación analítica

Las medidas de ultracentrifugación analítica se realizaron con fines auxiliares, con objeto de observar las posibles implicaciones de alteraciones en el equilibrio dímero-tetrámero de la fosforilasa b, en el proceso de unión de los efectores estudiados a la enzima.

La ultracentrífuga utilizada fue una Beckman Spinco Model E, con dispositivo óptico de Schlieren. Los experimentos se realizaron a 60.000 pm. con una duración media de unos 40 min. y realizándose fotografías cada dos minutos.

La determinación del coeficiente de sedimentación y el tanto por ciento de la forma dímero o tetrámero, presente en cada caso, nos han permitido completar los resultados calorimétricos.

Se utilizaron como coeficientes de sedimentación bibliográficos de la fosforilasa b a 25°C 8,4 S y 12.8 S para las formas dimérica y tetramérica, respectivamente (5).

CAPITULO IV

C A P I T U L O I V

Introducción

a) Conocimiento actual acerca de la acción de ligandos sobre la fosforilasa b

La reacción catalizada por la fosforilasa b transcurre a través del complejo ternario de la enzima con los dos sustratos, fosfato y glucógeno, cuya formación se ve favorecida por la previa unión de AMP a la enzima (74).

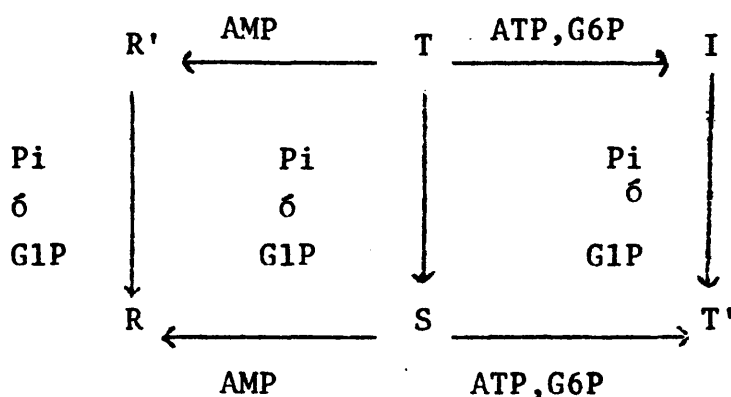
Los primeros estudios cinéticos realizados con esta enzima (94) parecían indicar que su comportamiento era describible según el modelo concertado, aunque otros autores intentaron adecuar el comportamiento de la fosforilasa b al modelo secuencial (95, 96). Sin embargo existen discrepancias entre el comportamiento cinético predicho por los modelos citados y el experimental.

Bresler y Firsov (97) intentaron reconciliar las discrepancias entre las propiedades cinéticas de la fosforilasa b y un modelo de transición concertada entre dos estados, introduciendo suposiciones adicionales al modelo alostérico que pueden resumirse del siguiente modo:

- a) La activación por AMP es de tipo K-V, es decir afecta a la catálisis enzimática y a la unión del sustrato.
- b) La unión de AMP no es exclusiva uniéndose en una extensión significativa a ambos estados conformacionales.

Por otra parte, la activación de la fosforilasa b por IMP (7) es de tipo V, es decir, afecta la velocidad máxima de la reacción sin alterar la afinidad de la enzima hacia el sustrato. Las diferencias de esta activación con respecto a la de AMP permitieron sugerir a Black y Wang (7) que la transición alostérica inducida por AMP constaba de dos fases: una primera, de elevación de la afinidad de la enzima hacia el sustrato y una segunda, de elevación de la eficiencia catalítica de la enzima. Según estas hipótesis IMP actuaría a nivel de la segunda fase, de acuerdo con las diferencias señaladas previamente, exigiendo, por otra parte, la existencia de una conformación enzimática adicional estabilizada por IMP, activa pero con baja afinidad hacia glucosa-1-fosfato.

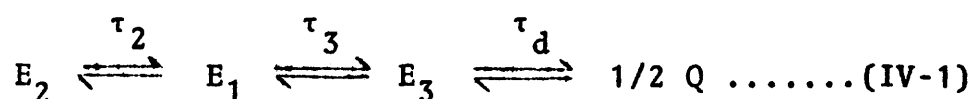
Madsen y col. (98) proponen el siguiente esquema conformacional para la enzima:



donde el estado enzimático T es el que predomina en ausencia de ligandos. Sólo al estado R se le atribuye una elevada actividad catalítica poseyendo los estados R' y S

una actividad catalítica baja, en tanto que los demás no serían catalíticamente activos.

Estudios de salto de temperatura realizados por Buc y col. (99) permitieron concluir que el menor número de estados conformacionales compatibles con los resultados experimentales conocidos, ya sea con enzima sola o con el complejo AMP-enzima es:



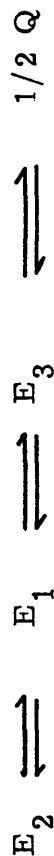
donde E_2 , E_1 y E_3 son estados conformacionales diméricos, Q la forma tetrámera de la fosforilasa \underline{b} y τ_2 , τ_3 y τ_d los tiempos de relajación entre los distintos estados conformacionales. Dichos estados se ven estabilizados en función de los diferentes ligandos y de la temperatura. (19). En la tabla I se resume esta situación.

Según Buc y col. (18) las interacciones homotrópicas entre los dos sitios de AMP a 4°C se establecen en el estado conformacional E_3 que puede formar el tetrámero a baja temperatura. Las marcadas diferencias de IMP respecto de AMP a 4°C (no agrega a la fosforilasa \underline{b} , no protege un único residuo -SH sino dos contra el ataque por DTNB y desplaza sólo una molécula de glucosa-6-fosfato por dímero - en tanto que AMP desplaza dos moléculas por dímero -) indican claramente que este nucleótido (IMP) ha de

TABLA I

Esquema conformacional propuesto por Buc y col.

En el se indican los estados conformacionales de la fosforilasa b hacia los que desplazan los diferentes ligandos.



Efectores unidos	2 G6P	2 IMP	2 AMP (baja T)	2 AMP (baja T)
por dimerio		2 AMP (alta T)	2 G1P ó Pi ó (G6P+IMP)	2 G1P ó G6P

Hay un desplazamiento competitivo de G6P por el activador alostérico AMP.

conducir a diferente estado conformacional que AMP a baja temperatura.

Según esta hipótesis en el estado conformacional E_1 , dos grupos -SH lentos son protegidos por el activador, en tanto que en la conformación enzimática E_3 , capaz de tetramerizar, sólo uno.

La transición de E_1 sigue el modelo concertado y a 4°C tiene lugar por adición de AMP solo o de glucosa-6-fosfato en presencia de IMP. Estos investigadores (18,101), proponen que es este estado o una subpoblación del mismo el que posee la máxima actividad catalítica.

No obstante, queda aún por conocer cual es la causa determinante de las transiciones conformacionales detectadas y las leyes que las rigen.

Estudios microcalorimétricos a 25°C y 18°C realizados por Wang y col. (16,17) han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- a) La unión de AMP a la enzima presenta dos regiones claramente diferenciadas, produciendo a 18° su asociación parcial a tetrámero, no observándose este efecto a 25°C.
- b) IMP sólo presenta un tipo de sitios de unión a la fosforilasa b a 25°C no observándose tampoco asociación de la enzima en estas condiciones.
- c) La unión de AMP a los sitios de mayor afinidad provoca la asociación de la fosforilasa b en tetrámeros.

La demostración directa de la existencia de dos clases de sitio se ha realizado por estudios de diálisis a 4°C (18) siendo la relación entre las respectivas constantes de disociación del segundo y primer sitio aproximadamente: 10.

Buc y col. (18) aportaron una serie de datos cinéticos y de diálisis que les permitieron establecer las siguientes propiedades de los sitios de unión de AMP:

1) La saturación por AMP del sitio de unión de menor afinidad por monómero se halla relacionada con una fuerte activación, una alta cooperatividad en la unión de distintos efectores y sustratos, la protección de un -SH lento por subunidad, el desplazamiento eficaz de la glucosa-6-fosfato unida a él y la elevación de la capacidad de la fosforilasa b de agregarse en tetrámeros.

2) Asignan estos investigadores la unión de los análogos tipo IMP al primer sitio de unión de AMP, cuya saturación, en consecuencia, caracterizan por un comportamiento cinético con pérdida del hábito sigmoideo, la no elevación de la capacidad de tetramerización de la fosforilasa b, la protección de dos -SH lentos por subunidad, un desplazamiento menos eficaz que el de AMP de la glucosa-6-fosfato y una menor activación del proceso catalítico.

R E S U L T A D O S

1. Interacción AMP-fosforilasa b . Acción del fosfato sobre esta interacción.

La valoración entálpica de la fosforilasa b con AMP a 25°C presenta dos mesetas distintas y bien definidas (fig.7) lo que pone de manifiesto la existencia de dos clases de sitios de unión de AMP por monómero de enzima (16, 17, 18).

La concentración final de enzima en la célula microcalorimétrica fue 2,67 mg/ml. Una representación de Hill de los resultados de la región AB de la fig. 7, proporciona un valor de $n=2,5$ que ratifica la alta cooperatividad homotrópica entre dos sitios de unión específicos de AMP, observada por otras técnicas (16,94,102).

A partir de la fig, 7 se obtienen valores de $-(77 \pm 2)$ kJ (mol monómero) $^{-1}$ y $-(284 \pm 4)$ kJ (mol monómero) $^{-1}$ para ΔH_1 y ΔH_2 , respectivamente. El cambio entálpico observado para el proceso de saturación del sitio de mayor afinidad hacia AMP (uno por monómero) - ΔH_1 - puede atribuirse a la unión de las moléculas de AMP a la enzima y al cambio conformacional producido por este efector en la enzima. El elevado cambio entálpico observado para la saturación del sitio de menor afinidad hacia AMP en la enzima - ΔH_2 - no puede explicarse en términos de un proceso de

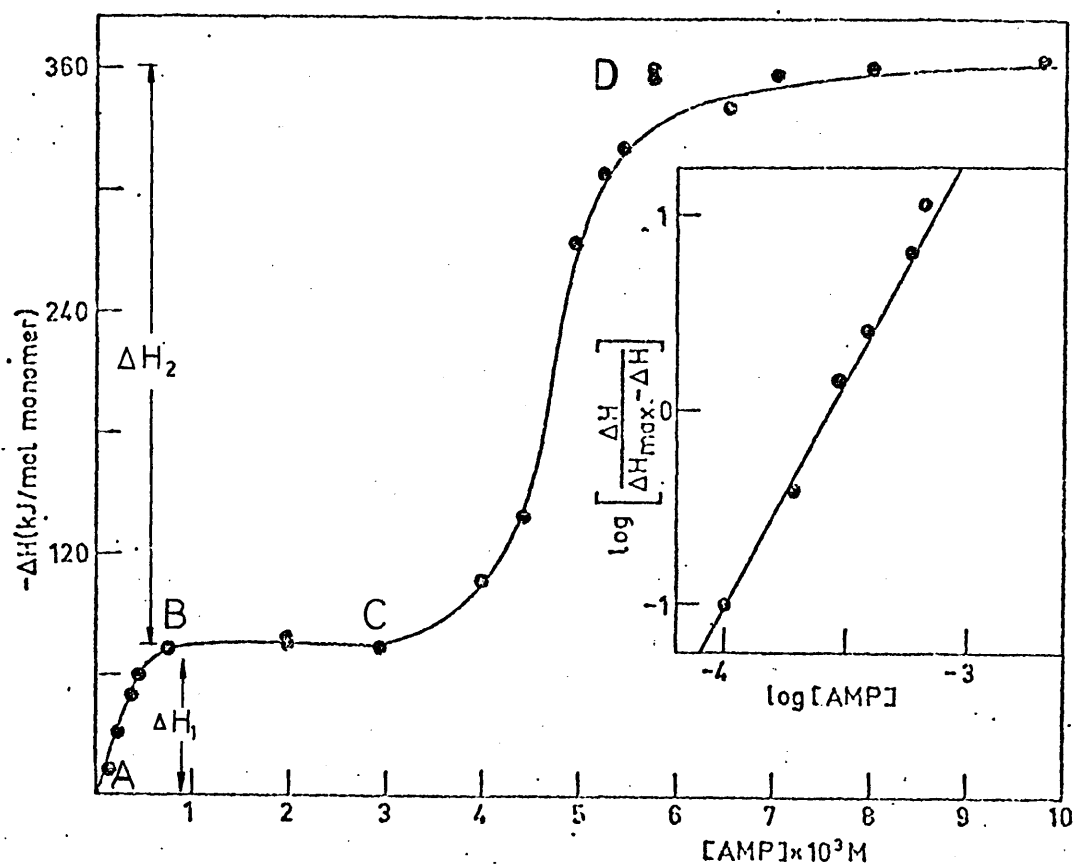


Fig. 7. - Curva de valoración entálpica de la fosforilasa b, 2.67 mg/ml, por AMP, 25°C. Representación de Hill de los datos de la región AB.

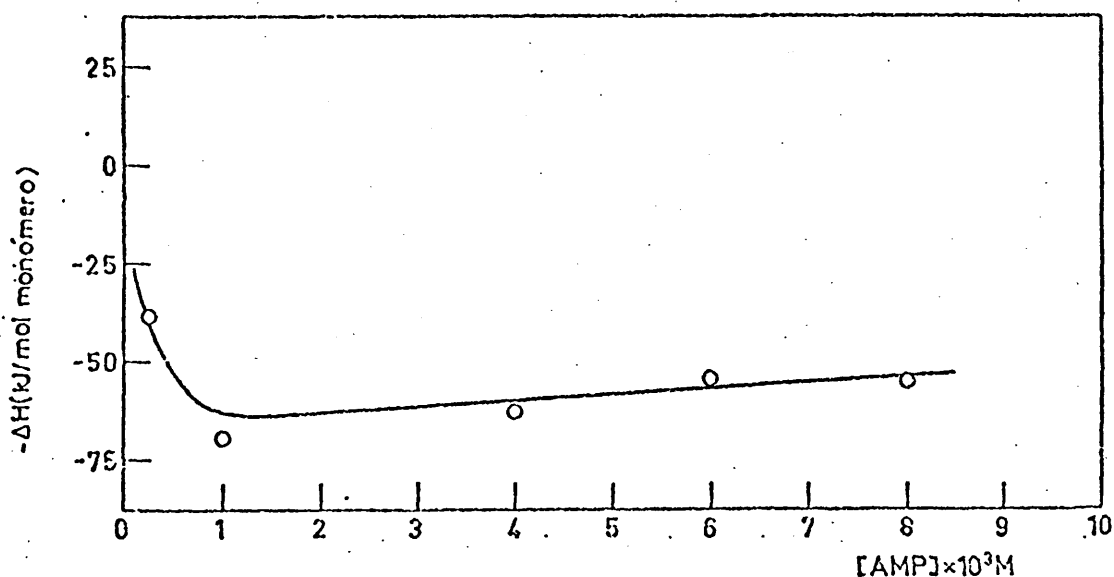


Fig. 8. - Valoración calorimétrica del complejo fosfato- fosforilasa b por AMP, a 25°C. [Fosforilasa] = 2.66 mg/ml y $2 \times 10^{-2} M$ fosfato.

unión y cambio conformacional ya que los valores de ΔH de interacción de nucleótidos con otras enzimas son del orden de 40 kJ mol^{-1} (103, 104). En principio podría suponerse debido a la suma de dos procesos fundamentalmente : el cambio conformacional producido en la enzima por la unión de las moléculas de AMP a esta clase de sitios y un proceso de asociación enzimática.

Con el fin de estudiar esta posible asociación enzimática se han realizado experimentos de ultracentrifugación en las mismas condiciones que los calorimétricos, observándose que: en ausencia de AMP la enzima se halla en estado dímero. En presencia de AMP 10^{-3}M la forma predominante (90-95% del total) es también la dimérica ($8,4 \text{ s}$), detectándose un pequeño porcentaje (5-10)% de tetrámero ($13,2 \text{ s}$). Por el contrario, en presencia de AMP 10^{-2}M la enzima se halla totalmente en su forma tetrámera, migrando con un solo pico simétrico (13, 25).

Ho y Wang (17) realizaron un estudio similar de la interacción AMP-fosforilasa b a 25°C , en tampón glicerofosfato $5 \times 10^{-2}\text{M}$ ($\text{pH} = 7.0$), obteniendo unos valores para ΔH_1 y ΔH_2 (de saturación) -55 y $-25 \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ respectivamente que difieren sensiblemente de los obtenidos en este trabajo.

Experimentos de ultracentrifugación en las condiciones descritas anteriormente (16) mostraron que a 10^{-3}M y 10^{-2}M

de AMP únicamente se obtenía una parcial tetramerización de la fosforilasa b, variable según la concentración de efector correspondiendo mayor porcentaje de tetrámero - para una concentración de AMP de 10^{-3} M, a 18°C.

Las diferencias citadas entre los resultados expuestos en este estudio y los obtenidos por Wang y col. (16,17) podrían explicarse en términos de los diferentes tampones utilizados, hipótesis apoyada por resultados obtenidos por diversas técnicas que muestran que el glicero-fosfato interacciona con la enzima (94,105,106).

Con objeto de analizar las diferencias entre nuestros resultados y los de Wang y col. (7), se ha estudiado la influencia del grupo fosfato en la interacción AMP-fosforilasa b. La figura 8 muestra la dependencia de la entalpía de interacción AMP-fosforilasa b con la concentración de nucleótido en presencia de una concentración saturante de fosfato ($2 \cdot 10^{-2}$ M) fig. 10).

Se pueden señalar dos diferencias fundamentales entre las figuras 7 y 8:

a) La región AB de la figura 7, correspondiente a la unión de AMP a sus sitios de mayor afinidad, se mantiene en la fig. 8, aunque el cambio entálpico asociado a tal interacción se hace endotérmico.

b) En presencia de fosfato la región CD de la figura 7 se ve casi completamente enmascarada.

Para determinar si el equilibrio dímero \rightleftharpoons tetrámero de la fosforilasa b , 2.67 mg/ml, se ve alterado por la presencia de fosfato ($2 \times 10^{-2}M$) se realizaron experimentos de ultracentrifugación a $25^{\circ}C$.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

a) La enzima en presencia de fosfato $2 \times 10^{-2}M$ migra en un pico simétrico de 8,6 S que corresponde a un dímero.

b) En presencia de fosfato $2 \times 10^{-2}M$ y de AMP $10^{-3}M$ se obtienen dos picos de 8,4 S (20%) y 12,8 S (80%).

c) En presencia de fosfato ($2 \times 10^{-2}M$) y AMP ($10^{-2}M$) están presentes también el dímero y el tetrámero, pero en este caso el porcentaje de forma dimérica es mayor (40%) que el señalado en el párrafo anterior.

En la figura 9 se puede observar el fuerte efecto que produce la variación de la concentración de fosfato sobre las entalpías de la interacción AMP- fosforilasa b . La concentración de AMP se mantuvo constante e igual a los valores de saturación del primer ($10^{-3}M$) y segundo ($10^{-2}M$) tipo de sitios de unión, estimados a partir de la fig. 7. En ambos casos el cambio entálpico observado demuestra que el proceso va haciéndose menos exotérmico al incrementarse la concentración de fosfato llegando incluso a ser endotérmico a altas concentraciones de sustrato. Ambas curvas presentan dos regiones, lo que podría indicar que el proceso global es la resultante de varios procesos distintos, uno

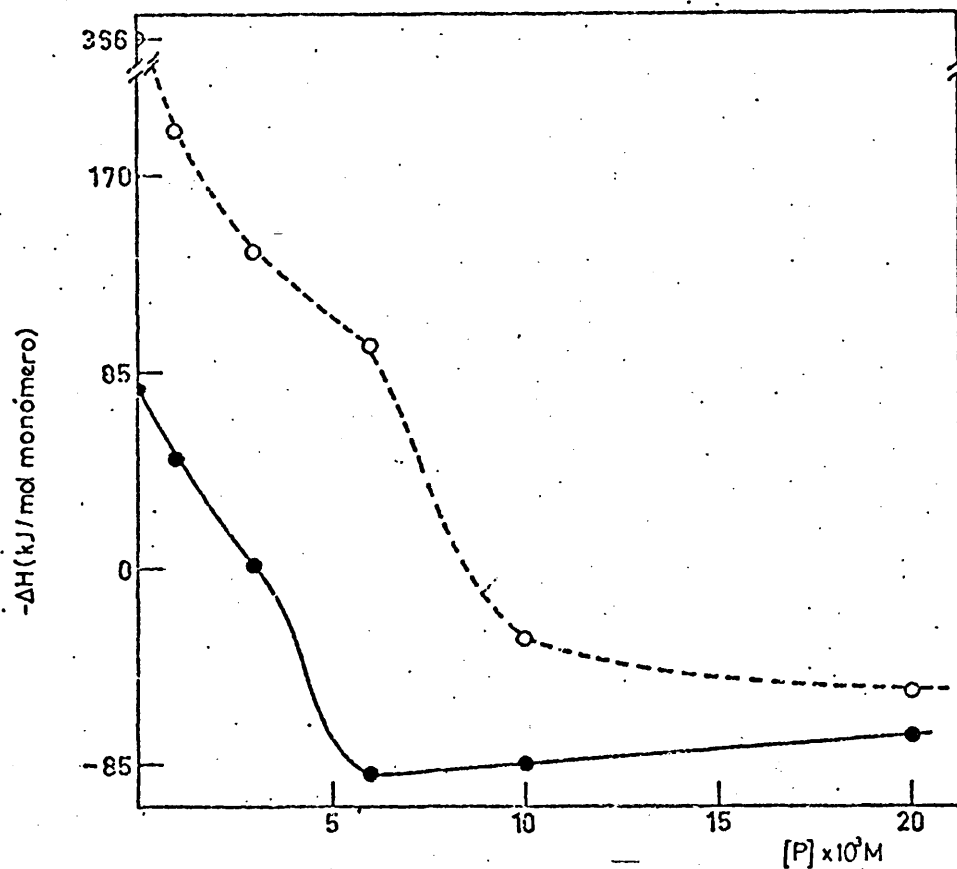


Fig. 9.- Interacción del AMP con el complejo fosfato-fosforilasa a 25°C. ----- AMP $10^{-2}M$ ——— AMP $10^{-3}M$

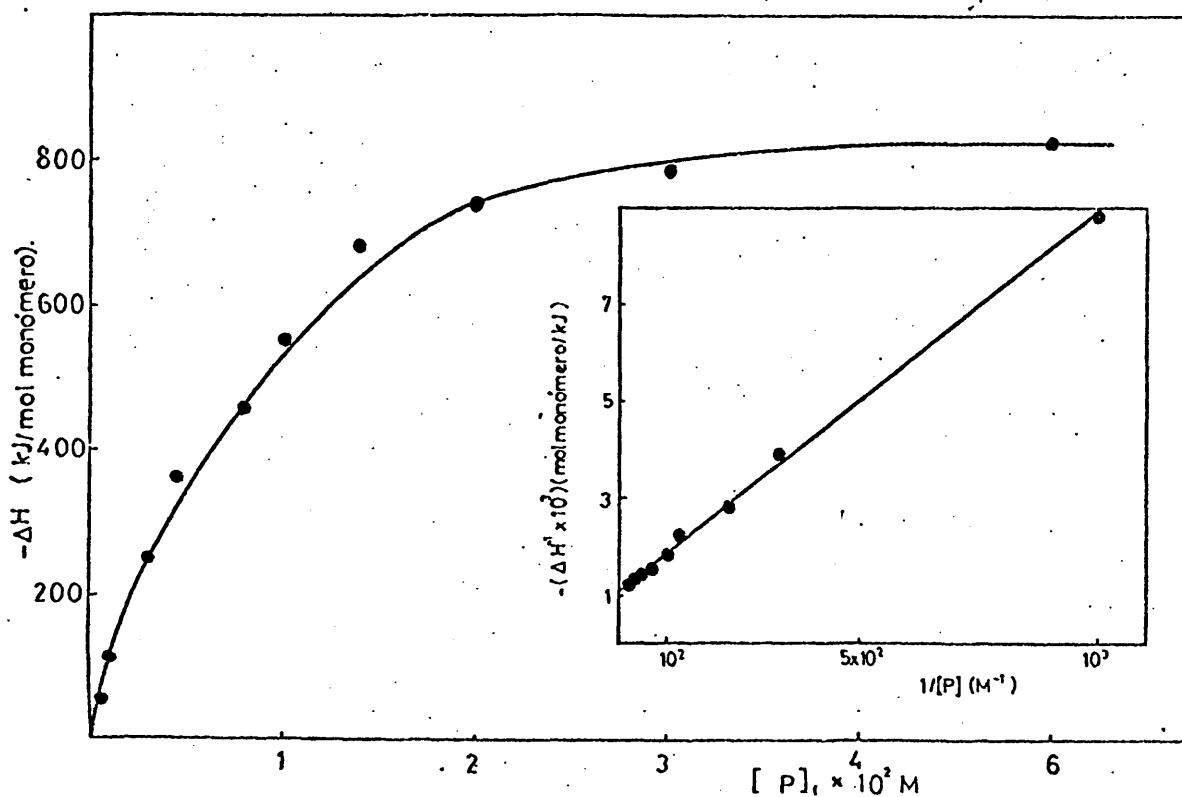


Fig.10.- Valoración entálpica de la fosforilasa b, 2.66 mg/ml, por P_i , a 25°C. Representación de inversos de los datos.

de los cuales podría ser el equilibrio dímero tetrámero de la enzima, como indican los resultados de ultracentrifugación.

Asimismo puede observarse que la diferencia entre las entalpías de las curvas de la figura 9 se estabiliza en un valor de $(20-25) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ a elevadas concentraciones de fosfato ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$). Ho y Wang (17) encontraron la misma diferencia entre las dos mesetas de la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP, en tampón glicerofosfato. Por tanto, es posible concluir que las diferencias en la acción del AMP sobre la enzima en tampón gly-gly y glicerofosfato se deben fundamentalmente a una fuerte interacción de este último compuesto con la enzima a través, posiblemente, del grupo fosfato.

DISCUSION.-

Los resultados obtenidos pueden interpretarse en términos del esquema conformacional propuesto por Buc y col. (40).

Postulamos que, cuando AMP se une a sus sitios de mayor afinidad en la enzima, el equilibrio se desplaza hacia el estado conformacional E_1 alostéricamente, como revela el hábito sigmoideo de la región AB de la fig.7. Pero cuando el AMP se une a los sitios de la enzima que exhiben una débil afinidad hacia esta molécula, en ausencia de fosfato, el equilibrio se desplaza completamente desde el es-

tado conformacional E_1 hasta el tetrámero (Q), proceso que muestra también una elevada cooperatividad positiva.

Los resultados en glicerofosfato (16 y 17) y los obtenidos en el presente trabajo en gly-gly pueden ser explicados si se considera que, en el esquema conformacional anterior, el fosfato desplaza a la enzima hacia E_1 o bien hacia E_3 . El fosfato facilitaría la unión de AMP a los sitios de débil afinidad y la consecuente tetramerización de la misma. Como la cooperatividad positiva en la saturación entálpica de la segunda clase de sitios casi desaparece en tampón glicerofosfato (16, 17), el fosfato ha de conducir a la enzima al estado conformacional E_3 , ya que es el equilibrio $E_1 \rightleftharpoons E_3$ el que confiere características alostéricas, a la segunda región de la curva de la fig. 7.

Un desglose cuantitativo de las diferentes aportaciones entálpicas (ionización, transfer, etc.) a la entalpía global medida de unión de AMP a la enzima, exige un conocimiento de los grupos químicos implicados en los centros de unión de AMP, de los sustratos y de asociación interdímeros, del cual carecemos actualmente.

2. Acción del glucógeno sobre la fosforilasa b. Su efecto sobre las interacciones fosfato-enzima y AMP-enzima.

Los estudios microcalorimétricos que se exponen a continuación se han obtenido a concentración de glucógeno saturante, $2.5' \times 10^{-3}M$ en restos de glucosa (69,74,97).

La entalpía de interacción entre la fosforilasa b (2,67 mg/ml) y el glucógeno ($2,5 \times 10^{-3}M$ en restos de glucosa) es altamente positiva : $+(113,0 \pm 1,0)$ kJ (mol monómero)⁻¹ - valor medio de tres experimentos -.

El valor obtenido para la K_m del complejo fosforilasa b-glucógeno a 25°C en tampón gly-gly, es de $5,0 \cdot 10^{-3}M$ teniendo la curva de activación obtenida un hábito hiperbólico. El cambio entrópico es de $-(101 \pm 2)$ e.u. (mol monómero) para la disociación del complejo glucógeno-fosforilasa b .

La figura 10 muestra la valoración entálpica de la fosforilasa b por fosfato. Como puede apreciarse en ella, la representación de inversos de los datos anteriores da una línea recta, lo que indica la ausencia, al menos aparente, de fenómenos alostéricos en la interacción fosfato-fosforilasa b. Por el contrario, como puede apreciarse en la figura 11, éstos son evidentes en la interacción del fosfato con el complejo fosforilasa b - glucógeno ($2,5 \times 10^{-3}M$ en restos de glucosa). Una representación de Hill de los datos de la figura 11 da un valor de $n = 1.9$ concordante con la alta interacción homotrópica entre dos sitios de unión de fosfato por dímero detectada por estudios cinéticos (102). El glucógeno, pues, conduce a un estado conformacional enzimático que permite la transmisión de efectos cooperativos entre los centros de unión del fosfato.

Por otra parte, a esta concentración de glucógeno la enzima debe estar casi completamente acomplejada con éste.

Por tanto, la constante de disociación aparente (K_d), calculada a partir de la figura 11, debe estar relacionada con las constantes intrínsecas de unión (K_1 y K_2) del fosfato al complejo glucógeno-fosforilasa \underline{b} : $K_d = K_1 \cdot K_2$ (107). El valor obtenido para K_d , $(6,6 \pm 0,7) \times 10^{-5}M$, da un valor medio de $K = \sqrt{K_1 \cdot K_2}$ igual a $(6,3 \pm 0,7) \times 10^{-3}M$ del mismo orden que el calculado a partir de resultados cinéticos. (74, 102).

Es preciso señalar que los altos valores de entalpía de interacción fosfato-fosforilasa \underline{b} , podrían ser atribuidos a una interacción no específica entre el fosfato (diagnón a pH = 6,9) y los grupos positivamente cargados de la superficie enzimática, ya que no se producen cambios apreciables en el estado de agregación de la fosforilasa \underline{b} por acción del fosfato. Según esta hipótesis, el glucógeno al acomplejarse con la enzima haría accesibles al medio un mayor número de grupos ionizables, capaces de interaccionar con el fosfato.

Los valores experimentales de las entalpías de interacción entre AMP y el complejo fosforilasa \underline{b} - glucógeno se han representado en función de la concentración de AMP en la figura 12, donde también se incluyen los datos experimentales de la interacción AMP-fosforilasa \underline{b} dados en la fig. 7. Puede observarse que el glucógeno afecta a la interacción AMP-fosforilasa \underline{b} de la siguiente manera:

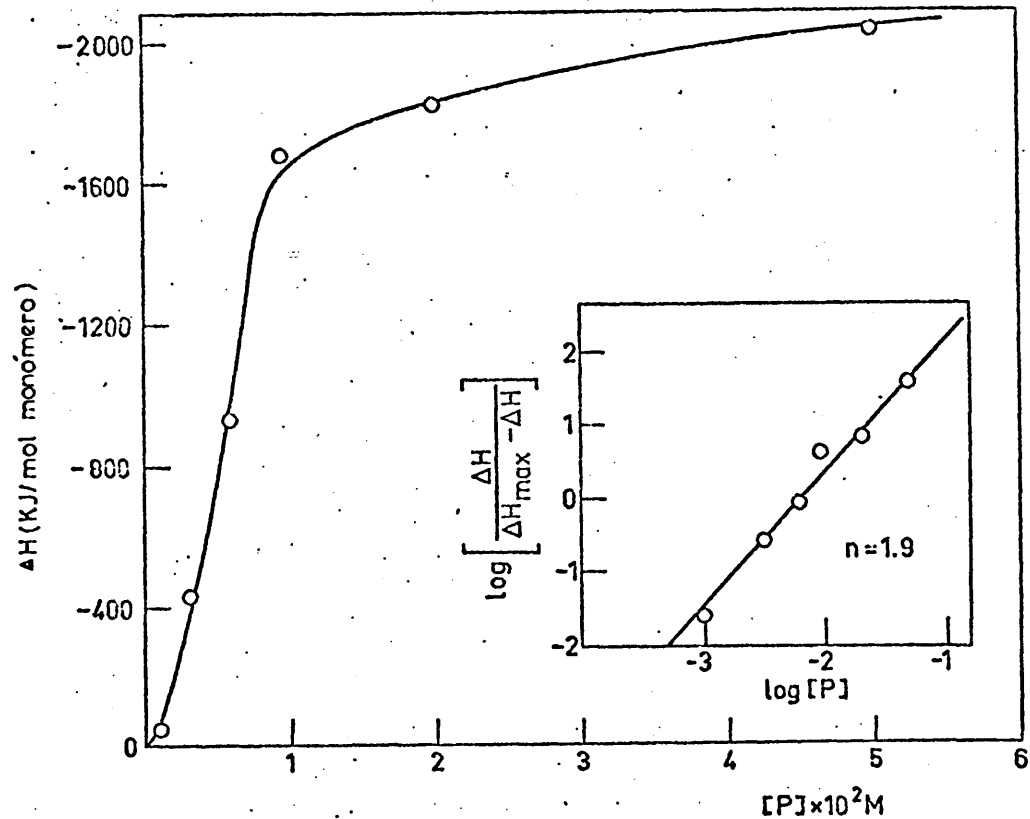


Fig.11. - Valoración entálpica del complejo fosforilasa-glucógeno por P_i a $25^\circ C$. Representación de Hill de los datos.

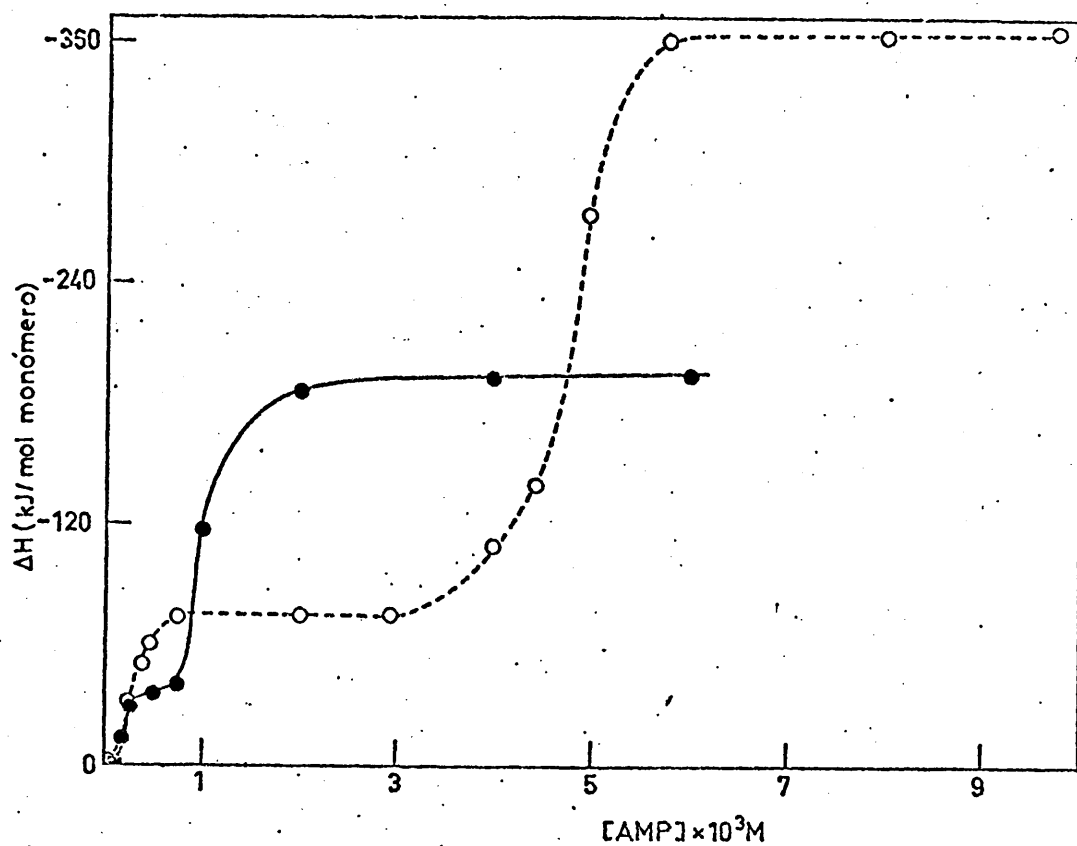


Fig.12. - Valoración entálpica de la fosforilasa con AMP (O) y del complejo fosforilasa β -glucógeno con AMP (●), a $25^\circ C$.

a) La entalpía de interacción AMP-fosforilasa b se reduce a un 50% aproximadamente en ambas mesetas en presencia de glucógeno (fig.12). Para la primera meseta las entalpías medidas son $-(37 \pm 2) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ y $-(77 \pm 2) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ en presencia y ausencia de glucógeno, respectivamente.

Para la segunda meseta las entalpías medidas, en presencia y ausencia de glucógeno, son $-(150 \pm 7) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ y $-(284 \pm 4) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ respectivamente. Al intentar explicar estos datos experimentales es preciso considerar posibles cambios en el estado de agregación de la fosforilasa b. Experimentos de ultracentrifugación muestran que en esta segunda meseta la forma tetrámera se halla presente a 2,67 mg/ml de enzima. En ausencia de glucógeno sólo existe tetrámero en esta segunda meseta, pero en su presencia ($2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en restos de glucosa) aparecen dos picos. El primero de 14,065 (60%) y el segundo de 63,96 S. Este último pico es muy ancho y debe corresponder a la formación de agregados: enzima-glucógeno ya que éste posee un coeficiente de sedimentación de 46 S. Cuando este experimento se realiza en idénticas condiciones, pero a una concentración saturante de glucógeno se observa únicamente la aparición de una banda ancha de agregados.

b) La afinidad de AMP hacia sus sitios de menor afinidad en la enzima se incrementa fuertemente por la acción del

glucógeno, en tanto que los sitios de mayor afinidad se ven afectados en menor extensión. Diversos estudios indican que los sitios de débil afinidad están directamente relacionados con la asociación de la fosforilasa b (17). En ausencia de glucógeno esta segunda clase de sitios se satura entre $3.0 \times 10^{-3}M$ y $6.0 \times 10^{-3}M$ de AMP, mientras que en presencia del polisacárido la saturación tiene lugar en el rango de concentraciones de AMP comprendido entre $(0.75 - 2.00) \times 10^{-3}M$. Los niveles de AMP "in vivo" alcanzan un valor máximo de $3 \times 10^{-4}M$ (5). Por otra parte, la catálisis heterogénea no ha sido excluida en la degradación "in vivo" de este polisacárido. Además, el citoplasma contiene granos sólidos de glucógeno. Por tanto, los resultados obtenidos parecen indicar que la catálisis de la degradación del glucógeno "in vivo" podía ser efectuada por la forma tetramérica de la fosforilasa b .

3. Efecto de la temperatura sobre la entalpía de interacción AMP-fosforilasa b y fosfato-fosforilasa b.

En la introducción de este capítulo se señaló la existencia de una transición conformacional dependiente de la temperatura en la fosforilasa b, detectada por medidas cinéticas (11,100) y de RMN (108).

Con objeto de conocer si esta transición afecta a las entalpías de interacción, fosfato o AMP -fosforilasa b, hemos realizado un estudio de éstas a diferentes

temperaturas. Los experimentos se realizaron a una concentración de enzima constante e igual a 2,67 mg/ml.

En la figura 13 se ha representado cómo afecta la temperatura a la entalpía de interacción fosfato-fosforilasa b. La concentración de fosfato utilizada fue $5 \times 10^{-2}M$, altamente saturante. En las figuras 14 y 15 se ha representado la variación de la entalpía de saturación de la primera y segunda regiones de la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP (fig.7) en función de la temperatura. Se puede observar (fig.16) que a $10^{\circ}C$ una concentración de AMP $10^{-3}M$ ya pertenece a la segunda región de la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP, lo que muestra que la afinidad de las dos clases de sitios de unión de AMP en la enzima aumenta a bajas temperaturas, lo cual concuerda con los resultados cinéticos obtenidos en función de la temperatura. Experimentos de microcalorimetría realizados a $10^{\circ}C$ en presencia de concentraciones finales de AMP superiores a $10^{-3}M$ no permiten alcanzar una línea estable durante más de 3 ó 4 minutos en el registro gráfico del experimento (véase métodos). El valor dado para $4 \times 10^{-3}M$ AMP ha de ser considerado tan sólo como una estimación. Este comportamiento anómalo puede estar relacionado con un aumento de agregación.

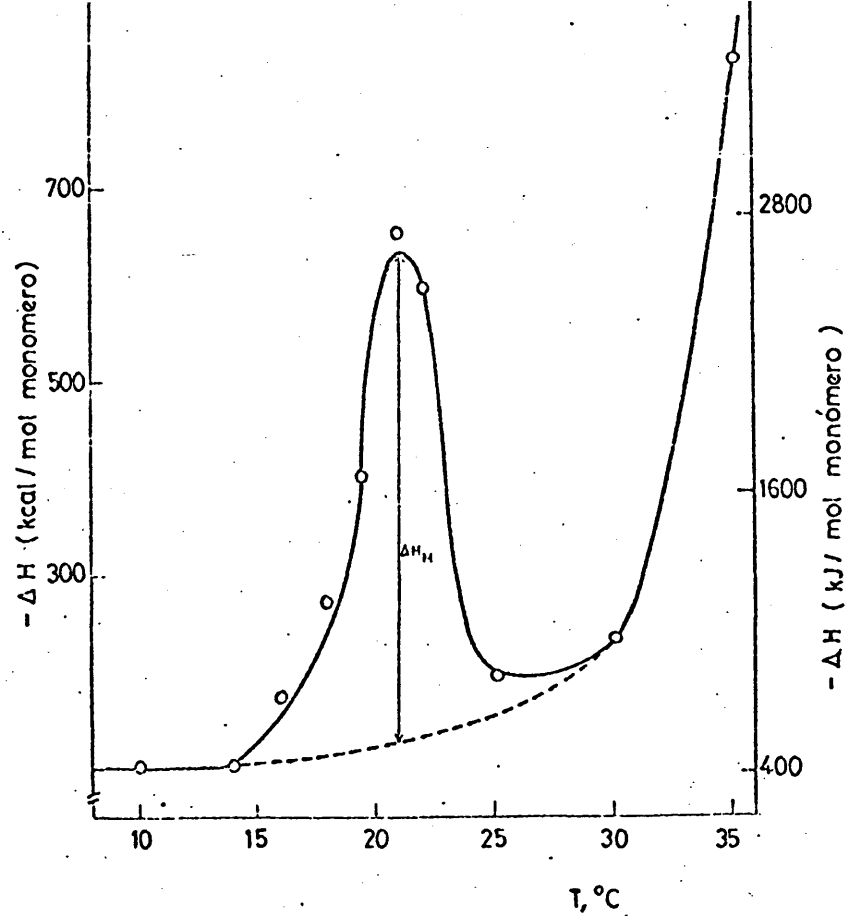


Fig. 13. - Variación de la entalpía de interacción fosforilasa \underline{b} - P_{i} en función de la temperatura.

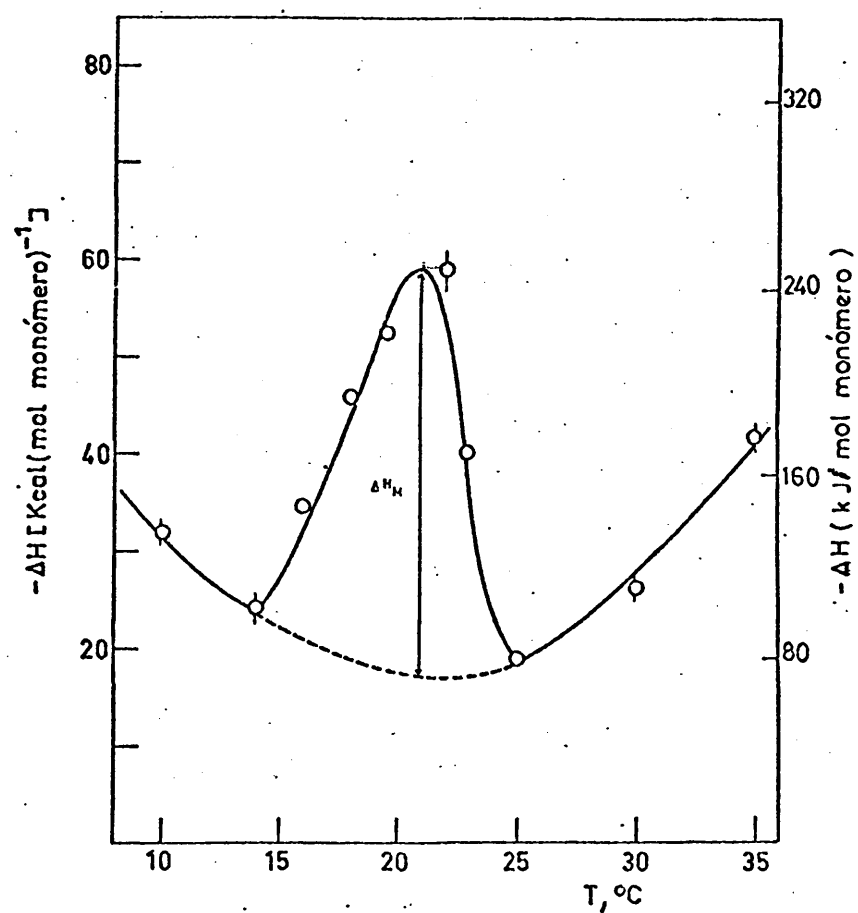


Fig. 14. - Variación de la entalpía de interacción fosforilasa \underline{b} -AMP 10^{-3}M , en función de la temperatura.

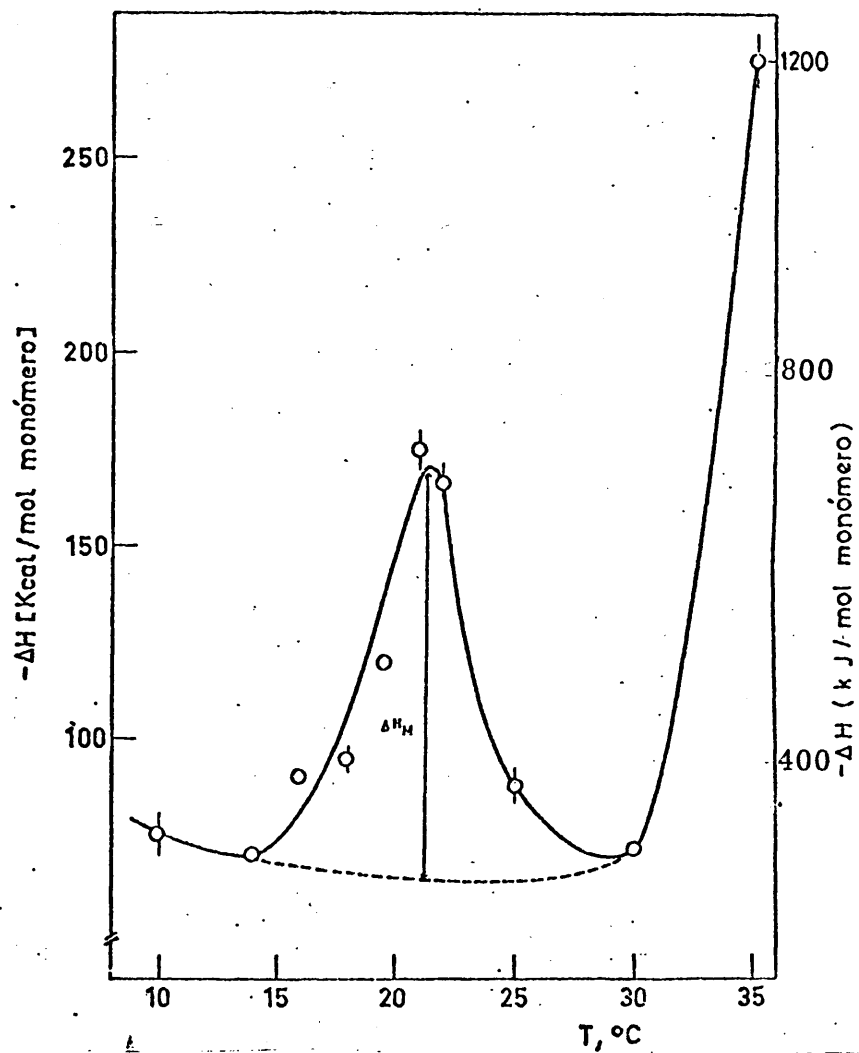


Fig.15. - Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b-AMP $10^{-2}M$, en función de la temperatura.

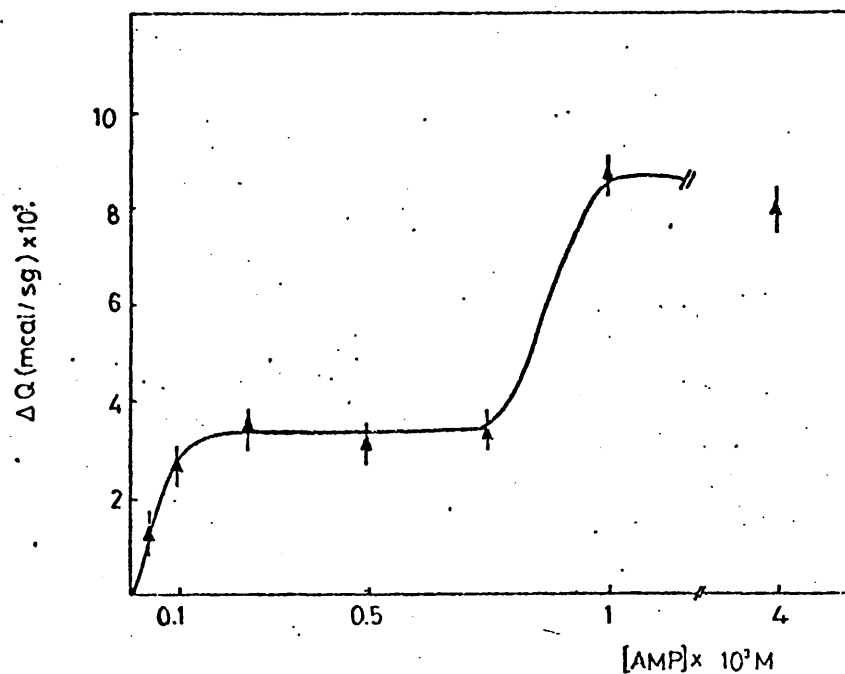


Fig. - 16. - Valoración entálpica de la fosforilasa b, 2,66 mg/ml por AMP a $10^{\circ}C$.

Discusión :

En las figuras 13, 14 y 15 puede observarse una abrupta discontinuidad entre (14-25)°C, con un máximo a 21°C. Los altos valores del salto entálpico no son debidos a cambios en el estado de agregación de la fosforilasa b en este intervalo de temperaturas, excepto en presencia de AMP 10^{-2} M, ya que los experimentos de ultracentrifugación realizados a 20°C, dieron resultados similares a los de 25°C. Sólo se observa una pequeña diferencia en la capacidad de agregación: a 20°C aparece un (5-10)% de tetrámero más que a 25°C, en presencia de fosfato saturante (5×10^{-2} M). En presencia de AMP 10^{-3} M a 20°C (saturación de los sitios de débil afinidad), la fosforilasa b no es capaz de tetramerizar, desapareciendo también el pequeño tanto por ciento de tetrámero que aparecía a 25°C. En presencia de AMP 10^{-2} M a 20°C, la fosforilasa b sigue también totalmente en forma dimérica.

La magnitud del incremento entálpico al pasar de 21 a 25°C, ΔH_M , debe ser considerado como la diferencia de entalpía al unirse al fosfato y el AMP 10^{-3} M a dos estados enzimáticos diferentes. En el caso de la figura 15, (AMP 10^{-2} M), el valor de ΔH_M incluye también la entalpía de tetramerización, ya que a 21°C la enzima está totalmente en estado dimérico y a 25°C en tetramérico.

Las curvas representadas en las figuras 13, 14

y 15 no pueden entenderse como una simple transición conformacional entre dos estados, ya que no presentan las características típicas de éstas (109), sino como dos transiciones conformacionales sucesivas entre dos estados, la primera exotérmica tiene lugar por debajo de 21°C ($\Delta H < 0$) y la segunda endotérmica ($\Delta H > 0$), que se observa por encima de esta temperatura. Esta hipótesis exige considerar que se forma un estado enzimático intermedio estable solo en un estrecho margen de temperaturas (alrededor de 21°C).

Resultados cinéticos (11, 100) y de RMN (108) detectan una transición conformacional enzimática, pero en un intervalo de temperaturas inferior a los 21°C. Los resultados de RMN muestran que esta transición conformacional altera la disposición estereo espacial de los grupos químicos situados en el centro de unión de AMP (108). Como este ligando se halla muy relacionado con la activación enzimática puede atribuirse al efecto cinético observado a dicha transición conformacional.

Más adelante, se señalarán las importantes coincidencias que presenta esta transición enzimática inducida por la temperatura con la transición conformacional enzimática detectada en función de la concentración de enzima, coincidencias que permiten pensar en una acción muy similar de ambas variables (temperaturas y concentración de enzima) sobre el sistema enzimático.

4.- Análisis de las curvas multiregionales obtenidas por microcalorimetría: Resultados obtenidos con AMP.

En el apartado IV-1 se explicaron cualitativamente los resultados entálpicos obtenidos en función del esquema conformacional propuesto por Buc y col. (99) para esta enzima, a 4°C, generalizándolo a 25°C.

En este apartado se analizará la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP para obtener las constantes intrínsecas de unión del efector alostérico a la enzima y de tautomerización del sistema enzimático. El método de análisis utilizado (fig.7) se aplicará -- después a las curvas de valoración entálpica de la enzima con otros nucleótidos que exhiban dos regiones netamente diferenciadas.

Puesto que los resultados cinéticos publicados por diversos investigadores (94, 97) indican una unión -- prácticamente exclusiva de AMP al estado R de la enzima, en el tratamiento alostérico de los datos calorimétricos obtenidos, se ha supuesto que el ligado se une exclusivamente al estado R_i ($i= 1,2$) de la clase i -ésima de sitios, lo cual simplifica enormemente el problema.

Por otra parte, dada la neta separación de las dos mesetas en la curva de valoración de la fosforilasa b por AMP en glygly, cada región puede ser estudiada separadamente. Por tanto, la intersección AMP-fosforilasa b - puede dividirse en dos partes:

a) Estudio de la saturación de los sitios de mayor afinidad hacia AMP por éste, proceso que corresponde al desplazamiento del equilibrio alostérico: ---
 $E_2 \rightleftharpoons E_1$ ($T_1 \rightleftharpoons R_1$) hacia E_1 .

b) Estudio de la saturación de la segunda - clase de sitios de unión por AMP. Puede correlacionarse con el desplazamiento del equilibrio alostérico :-
 $E_1 \rightleftharpoons E_3$ ($T_2 \rightleftharpoons R_2$) hacia E_3 que se estabiliza - inmediatamente por su conversión en tetrámero (Q).

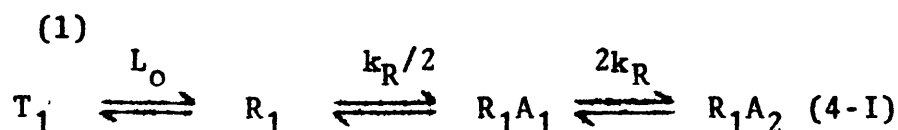
Como se indicó en la introducción de este - capítulo, el comportamiento cinético de la fosforilasa b, difiere levemente del predicho por el modelo concertado, diferencias asignables a la existencia de más de dos estados conformacionales en equilibrio. Por esta razón, se ha supuesto que las transiciones $E_2 \rightleftharpoons E_1$ y $E_1 \rightleftharpoons E_3$ se rigen por el modelo concertado.

A continuación, se analizará cada proceso de saturación por separado.

a) Estudio de la saturación de los sitios de mayor afinidad.

Debido a las características sigmoideas que presenta la primera región de la curva mostrada en la fig. (7) puede considerarse pequeña la población de - los estados intermedios de saturación (R_1A). En primera aproximación se puede considerar que $\Delta H \approx \bar{Y}$. Una representación de Hill de los datos entálpicos de --

esta primera región se ajusta bien a una línea recta, (n = 2.5) confirmando que la hipótesis acerca de la importancia de los estados intermedios de saturación (R₁A) es probablemente correcta. La representación cinética de la primera región de dicha curva es pues:



donde T₁ y R₁ son los estados conformacionales enzimáticos en equilibrio en ausencia de ligando A = AMP
⁽¹⁾L₀ la constante de equilibrio transconformacional en ausencia de ligando y k_R la constante global de disociación de las dos moléculas de AMP. Por tanto, k_R = k₁ · k₂ = ⁽¹⁾k_R² donde ⁽¹⁾k_R es la constante intrínseca de unión de AMP a los dos sitios de unión equivalentes de R₁.

Considerando el anterior esquema cinético se puede expresar el calor experimental de interacción a una concentración dada de AMP ⁽¹⁾Δ(Q_T) de la forma siguiente:

$$(1) \Delta Q_t = 2 \cdot (1) \Delta H_b (R_1A_2) + (1) \Delta H_t \Delta(R_1) + (1) \Delta H_b (R_1A_1) \quad (4-II)$$

donde: ⁽¹⁾ΔH_b es la entalpía de unión de una molécula de AMP a la enzima.

}

Δ(R₁) es la diferencia entre la concentración de la enzima en el estado R₁ en presencia de AMP y de enzima en el estado R₁ en ausencia de ligando.

ΔH_t es la entalpía asociada al cambio trans conformacional $T_1 \rightleftharpoons R_1$ inducido por AMP en la enzima.

(E_t) es la concentración total de enzima.

El valor de $\Delta(R_1)$ puede ser evaluado como :

$$\Delta(R_1) = \frac{(R_1) + (R_1A_1) + (R_1A_2) - (R_1)_0}{(E_t)} \quad (4-III)$$

donde (R_1) y $(R_1)_0$ son las concentraciones de enzima en las formas libres, en presencia o ausencia de AMP, respectivamente.

Los valores de L_0 dados en la bibliografía -- para el equilibrio alostérico de la fosforilasa b son -- altos (600, Buc (94); 5000, Kastenschmidt y col. (11) -- en diferentes condiciones experimentales). En primera aproximación se supone que la concentración de enzima libre en la forma R_1 es pequeña, ya sea en presencia -- o en ausencia de AMP. La ecuación (4-II) adquiere, -- pues, la siguiente forma:

$$\frac{{}^{(1)}\Delta Q_t}{(E_t)} = ({}^{(1)}\Delta H_t + 2 {}^{(1)}\Delta H_b) \overline{(R_1A_2)} + ({}^{(1)}\Delta H_t + {}^{(1)}\Delta H_b) \overline{(R_1A_1)} \quad (4-IV)$$

donde $\overline{(R_1A_2)}$ y $\overline{(R_1A_1)}$ son las fracciones de las formas R_1A_2 y R_1A_1 para una concentración dada de AMP. Ambos -- valores puede ser calculado como una función de la con

centración de AMP y de las constantes de equilibrio -
del esquema (4-I):

$$\overline{(R_1 A_2)} = \frac{\overline{(R_1)} (A)^2}{k_T} \cdot \overline{(R_1 A_1)} = \frac{2 A}{k_R} \overline{(R_1)}$$

Considerando dicho esquema, la concentración
total del enzima viene dada por la siguiente expresión:

$$\overline{(R_1)} + \overline{(R_1 A_1)} + \overline{(R_1 A_2)} + \overline{(T_1)} = \overline{(E_t)}$$

o en términos de fracciones molares simplemente por la
expresión:

$$\overline{(R_1)} + \overline{(R_1 A_1)} + \overline{(R_1 A_2)} + \overline{(T_1)} = 1$$

donde $\overline{(R_1)}$, $\overline{(R_1 A_1)}$, $\overline{(R_1 A_2)}$ y $\overline{(T_1)}$ son las fracciones -
molares de cada forma enzimática.

$$\overline{(R_1)} = \frac{1}{1 + (1)_{L_0} + \frac{(A)^2}{(1)_{k_T}} + \frac{2 A}{(1)_{k_R}}} \quad (4-V)$$

donde $(1)_{L_0}$ es la constante alostérica.

Sustituyendo:

$$(1)_{\Delta H_t} + 2 (2)_{\Delta H_b} \text{ por } (1)_{\Delta H_p}, \text{ siendo } (1)_{\Delta H_p} = -(154 \pm 4)$$

$\text{kJ (mol dímero)}^{-1}$, la entalpía de la primera meseta,
la expresión (4-IV) puede escribirse:

$$(1)_{\Delta H_T} = \frac{(1)_{\Delta H_p} \alpha^2}{(1)_{L_0} + (1+\alpha)^2} + \frac{(1)_{\Delta H_p} (1)_{\Delta H_b}}{(1)_{L_0} + (1+\alpha)^2} \frac{2 \alpha}{(1)_{L_0} + (1+\alpha)^2} \quad (4-VI)$$

Si definimos $\alpha = \frac{(A)}{(1)k_R}$ y consideramos que $k_T =$

$(1)k_R^2$ se obtiene :

$$\frac{\Delta H_T}{(1)\Delta H_P} = \frac{\alpha(\alpha + 2(1 - \frac{(1)\Delta H_b}{(1)\Delta H_P}))}{\alpha^2 + 2\alpha} \cdot \frac{(1)L_O + (1+\alpha)^2}{(1)L_O + (1+\alpha)^2} \quad (4 - VIII)$$

Esta expresión es diferente de la que da para la función de saturación el modelo concertado, para la unión exclusiva a un solo estado (R) y $n = 2$:

$$Y \frac{\alpha(1+\alpha)}{L_O + (1+\alpha)^2} \quad (4-IX)$$

A partir de los datos experimentales se han ajustado los parámetros $(1)k_R$ y $(1)L_O$. Para ello, se ha barrido un rango de valores de $(1)k_R$ entre 10^{-6} y 10^{-3} molar⁻¹ y se ha elegido aquel intervalo de valores de $(1)k_R$ que da un valor más constante de $(1)L_O$. Los parámetros obtenidos son:

$$(1)L_O = 600-700 \text{ y } (1)k_R = (1.0-1.2) \times 10^{-5} M^{-1}.$$

En la tabla II se da la población relativa de los diferentes estados enzimáticos (véase el esquema 4-I) calculada utilizando los parámetros $(1)L_O$ y $(1)k_R$, indicados en la misma. Puede observarse que el total de los porcentajes dados en la tabla II para

TABLA II

Población relativa de los diferentes estados del esquema cinético
para la primera región de la curva de valoración de fosforilasa por AMP (a)

[AMP](M)	$R_1\%$	$T_1\%$	$R_1A_1\%$	$R_1A_2\%$
10^{-3}	0,009	6,37	1,82	91
$7,5 \times 10^{-4}$	0,015	10,5	2,25	84,38
$3,5 \times 10^{-4}$	0,05	35	3,5	61,25
$1,75 \times 10^{-4}$	0,095	67	3,35	29,3

(a) Estos valores se han calculado tomando ${}^{(1)}L_o = 700$ y ${}^{(1)}k_R = 1.0 \times 10^{-5}$

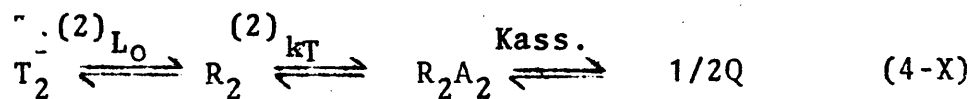
diferentes concentraciones de AMP es siempre mayor que 99,4%.

El porcentaje de la forma R_1 libre es, menor de un 0,1% del valor de R_1A_2 . Por lo que el error introducido en la entalpía total debido al ajuste es inferior a 2 kJ (mol monómero)⁻¹, dentro del error experimental.

A partir de los valores obtenidos para ⁽¹⁾ L_O y ⁽¹⁾ k_R se han calculado los de la función de saturación (\bar{v}_1) a diferentes concentraciones de AMP. Con ellos se ha realizado una representación de Hill, que conduce a una recta de pendiente igual a 1.96, lo que confirma la alta cooperatividad entre los dos sitios de alta afinidad hacia AMP existentes en el dímero enzimático.

b) Estudio de la saturación de los sitios de menor afinidad.

El conjunto de equilibrios implicados en este proceso puede ser esquematizado como:



donde T_2 y R_2 son los estados diméricos con baja y alta afinidad relativa hacia la unión de AMP a sus sitios de menor afinidad, respectivamente. Se ha despreciado la participación en el equilibrio de las formas semisaturadas, R_2A y saturada R_1A_2 , no tetramerizadas,

ya que el hábito de la segunda región de la curva de saturación entálpica por AMP (fig. 7) indica la alta cooperatividad de este proceso. Para formular el anterior esquema se ha realizado, además, la suposición - (previamente señalada) de que la unión del ligando -- (AMP) es exclusiva al estado R_2 .

El tratamiento del equilibrio anterior se - ha realizado considerando las siguientes hipótesis de partida:

(1) La población enzimática en la forma R_2 puede ser despreciada.

(2) La forma enzimática R_2A_2 se transforma rápidamente en el estado tetramérico (Q) pudiendo pues considerarse despreciable la población del primero.

Es preciso señalar que la hipótesis de unión exclusiva al estado enzimático R_2 puede ser justificada considerando que, aunque la saturación de la segunda - clase de sitios de unión de AMP tiene lugar a altas concentraciones de AMP, en ausencia de sustrato, no debe - ser excluida su participación en el proceso catalítico - ya que este proceso de saturación se ve fuertemente afectado por los sustratos, fosfato y glucógeno, como se demostró previamente. Por otra parte, la activación de la fosforilasa b por AMP sigue el modelo concertado considerando unión exclusiva del activador a un estado conformacional (94,97).

La hipótesis (1) está justificada si $(2)_{L_0}$ es muy alto, lo cual resulta obvio al observar lo abrupto de la transición que tiene lugar para la saturación de la segunda región de la curva de la fig. 7.

El calor experimental total medido para la unión de AMP a la segunda clase de sitios de unión puede ser expresada, en general como:

$$\begin{aligned} (2)_{\Delta} Q_T = & (2)_{\Delta} H_t (\Delta(R_2) + (R_2 A_2) + 2 (Q)) + \\ & 2 (2)_{\Delta} H_b ((R_2 A_2) + 2 (Q)) + \Delta H_{ass} (Q) \end{aligned} \quad (4-XI)$$

ecuación que puede ser enormemente simplificada considerando las suposiciones hechas previamente:

$$\begin{aligned} \Delta Q_T = & 2 ((2)_{\Delta} H_t + 2 \cdot (2)_{\Delta} H_b + 1/2 \Delta H_{ass}) (Q) = \\ & = (2)_{\Delta} H_p \cdot 2 (Q) \end{aligned} \quad (4-XII)$$

donde $(2)_{Q_T}$ es el calor total observado para una concentración dada de AMP menos $(1)_{\Delta} H_p$; $(2)_{\Delta} H_b$ y $(2)_{\Delta} H_t$ son las entalpías de unión de AMP y del cambio conformacional inducido en la enzima ($T_2 \longrightarrow R_2$), respectivamente; ΔH_{ass} es la entalpía de asociación: dímero \rightleftharpoons tetramero; $(2)_{\Delta} H_p$ es la diferencia de entalpías entre las dos mesetas de la fig. 7.

Las concentraciones de las distintas formas enzimáticas en el equilibrio nos permiten obtener:

$$\frac{K_{ass}^2 A^4 (R_2)^2 + (1 + (2)_L) (R_2) - E_t}{(2)_{K_R}^2} = 0 \quad \dots (4-XIII)$$

$$R_2 = \frac{(1 + (2)L) \sqrt{(1 + (2)L)^2 + 8 K_{ass}^2 (A)^4 E_T / (2) k_T^2}}{4 K_{ass} (I)^4} \quad (4-XIV)$$

$$(2) k_T^2$$

considerando sólo el valor positivo de la raíz, puesto que el negativo nos permitiría obtener un valor de concentración de R_2 negativo, lo cual es físicamente absurdo. En las ecuaciones anteriores:

$$K_{ass} = \frac{(I)^{1/2}}{(L_2 A_2)}, \quad (2) k_T = \frac{(R_2)(A^2)}{(R_2 A_2)}$$

$$(2) L_0 = \frac{(E_2)}{(R_2)}; \quad \alpha = \frac{(A)}{(2) k_T^{1/2}}$$

La ecuación 4-XII se transforma en ;

$$(2) \frac{\Delta}{\Delta P} = (8 K_{ass}^2 (E_A \alpha^4)^{-1} - (1 + (2)L) + (1 + (2)L + 8 K^2 (E_t \chi A)^4)^2) \quad (4-XV)$$

Para que los resultados experimentales se ajusten a la ecuación anterior es preciso que:

$$(2) L = \frac{2 L_0}{(1 + \alpha)^2}$$

De acuerdo con lo postulado previamente por Ho y Wan (18) la unión de dos moléculas de AMP a un estado dimérico induce directamente la tetramerización de la enzima, este estado dimérico ha de ser pues E_3 . La dependencia de $(2)L$ de la segunda potencia de (A) justifica que este mecanismo ha de ser el único viable para ex-

plicar los resultados entálpicos experimentales. De todas formas, se formuló el esquema cinético que implica la tetramerización de la forma semisaturada R_2A , seguida de la unión de AMP a los dos sitios aún libres en el tetrámero. Los resultados experimentales no se ajustan satisfactoriamente a los predichos por esta aproximación teórica.

Utilizando valores de K_{ass}^2 comprendidos entre 2×10^5 y $2 \cdot 10^2$ se han variado los parámetros $(2)_{k_R}$ entre 10^{-5} y 10^{-2} y $(2)_{L_0}$ entre $(10^4 - 10^6)$ hasta obtener un ajuste aceptable de los valores teóricos de los experimentales. Los valores de los tres parámetros que conducen a un mejor ajuste de los resultados experimentales son:

$$K_{ass}^2 = 2 \cdot 10^5 M^{-1} (2)_{L_0} = (5-6) 10^4 \text{ y } (2)_{k_R} = (1,9-2,0) \times 10^{-4} M.$$

La segunda región (la línea continua) de la curva mostrada en la fig. 7 ha sido ajustada teóricamente con estos valores.

Con los datos alostéricos obtenidos a partir del estudio de las dos regiones de la curva mostrada en la fig. 7 se ha calculado la función de saturación mostrada en la fig. 17.

Discusión.-

Como se comentó anteriormente AMP no se une al tetrámero. Sin embargo, en disolución el sistema se comporta en una manera "cuasi-tetramérica". Este

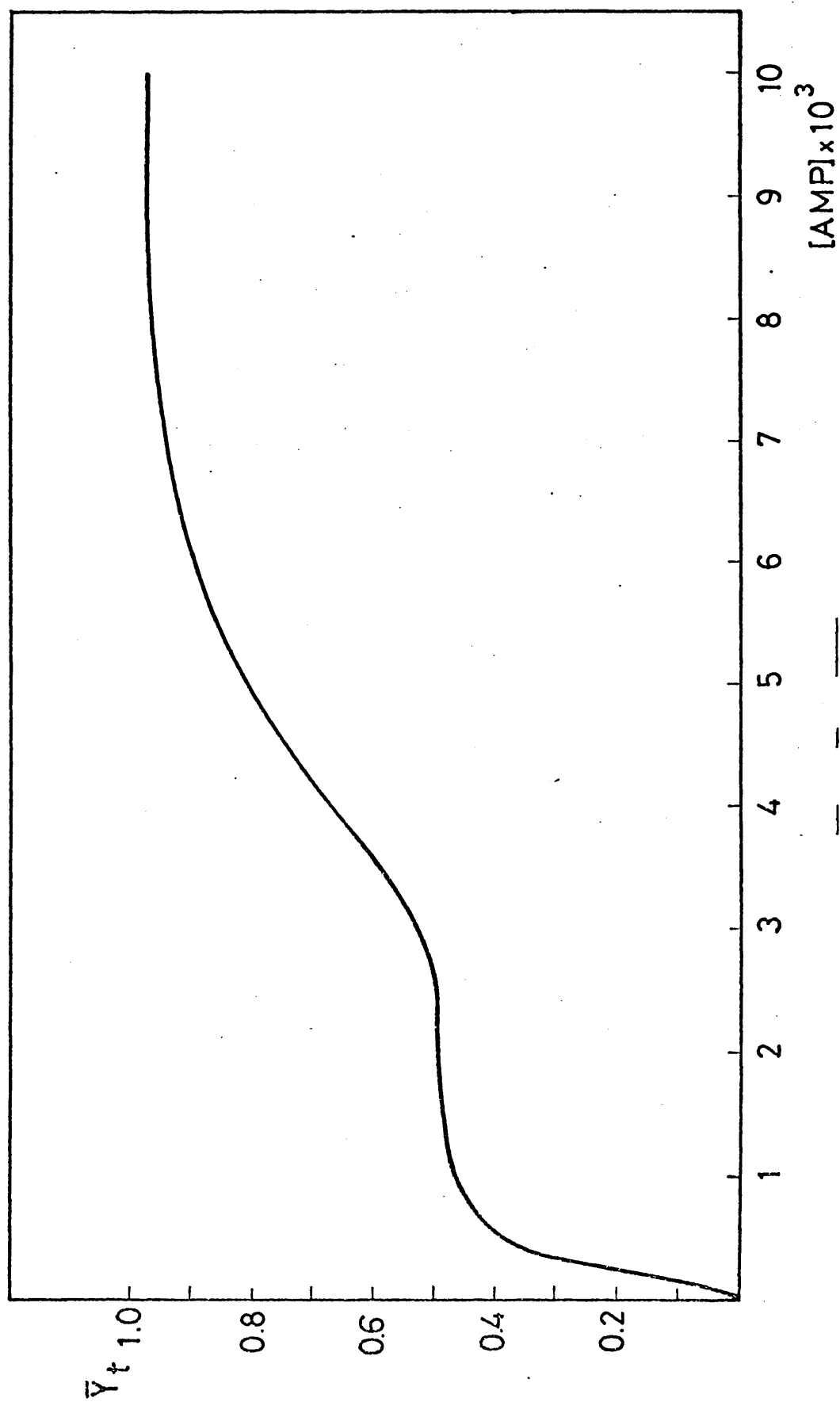
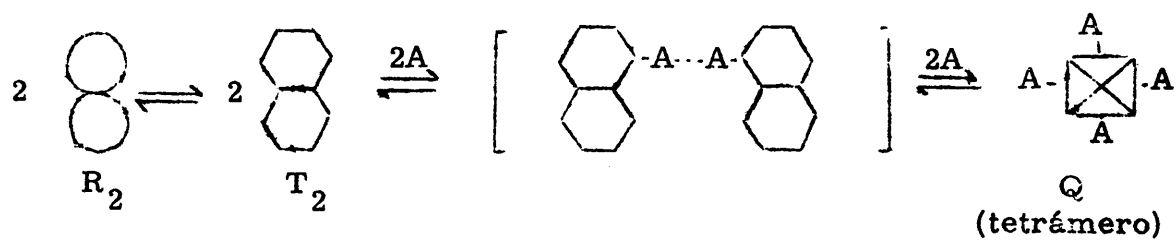


Fig. 17.- Función de saturación total, $\bar{Y}_T = \bar{Y}_i + \bar{Y}_1 Y_2$, en función de la concentración de AMP.

hecho puede ser explicado si se considera que AMP forma débiles puentes de unión entre dímeros adyacentes.

La unión de AMP a su sitio de menor afinidad puede ser interpretada del siguiente modo. Aquí la tetramerización por AMP requiere inicialmente un débil puente de unión realizado por AMP entre dos dímeros adyacentes, como se deduce de los resultados calorimétricos analizados. El proceso puede ser esquematizado:



En este esquema aparecen conjuntos de cuatro centros-ensamblados dinámicamente sin exigir la formación previa del tetrámero, que permiten explicar el comportamiento experimental del sistema.

CAPITULO V

C A P Í T U L O V

DEPENDENCIA DE LA INTERACCION AMP-FOSFORILASA β Y FOSFATO-FOSFORILASA β CON LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Las constantes de disociación del complejo AMP-enzima obtenidos por diferentes técnicas experimentales no concuerdan, (10,94,102,106,110,111) debido posiblemente al amplio margen de concentración enzimática utilizada, 0.01 mg/ml (en cinéticas de activación) hasta 8 mg/ml (diálisis en el equilibrio).

Debido a que la técnica calorimétrica nos permite utilizar un amplio margen de concentración enzimática, hemos realizado un estudio de la interacción AMP-fosforilasa β y fosfato-fosforilasa β , a 25°C, en función de la concentración de enzima, cuyos resultados se exponen a continuación.

Los resultados obtenidos conducen a proponer un nuevo esquema conformacional para explicar el comportamiento de la fosforilasa β , en el que la variable, concentración de enzima, desempeña un importante papel.

Resultados

La curva de valoración entálpica de la fosforilasa b (1 mg/ml) por AMP, fig. 18, presenta dos regiones bien definidas, correspondientes a los dos sitios de unión de distinta afinidad para el AMP. En esta figura se ha incluido la curva de valoración entálpica de fosforilasa (2,67 mg/ml) por AMP ya mostrada en la fig. 7. Puede apreciarse que la principal diferencia entre ambas curvas estriba en los valores entálpicos de las dos mesetas.

Normalizando en ambas curvas los valores entálpicos asociados a las dos mesetas y representando en abcisas:

moléculas AMP (considerando un sitio de cada clase por monó-
sitio de unión
mero), se observa que las curvas de valoración entálpica de la enzima con AMP obtenidas a 1,0 mg/ml y 2,67 mg/ml se saturan a la misma relación AMP/enzima, fig.19, lo que demuestra que pueden ser descritas de idéntico modo desde un punto de vista teórico. El primer sitio se satura, desde un punto de vista entálpico, cuando la relación de moléculas AMP/sitio es (30-34), apareciendo la primera meseta definida entre: 34 y 120 moléculas AMP/ sitio de unión en ambos casos; es decir, independientemente de la concentración de enzima utilizada.

La segunda clase de sitios se satura en ambas curvas, aparentemente, cuando la relación moléculas AMP/sitio es (270-300).

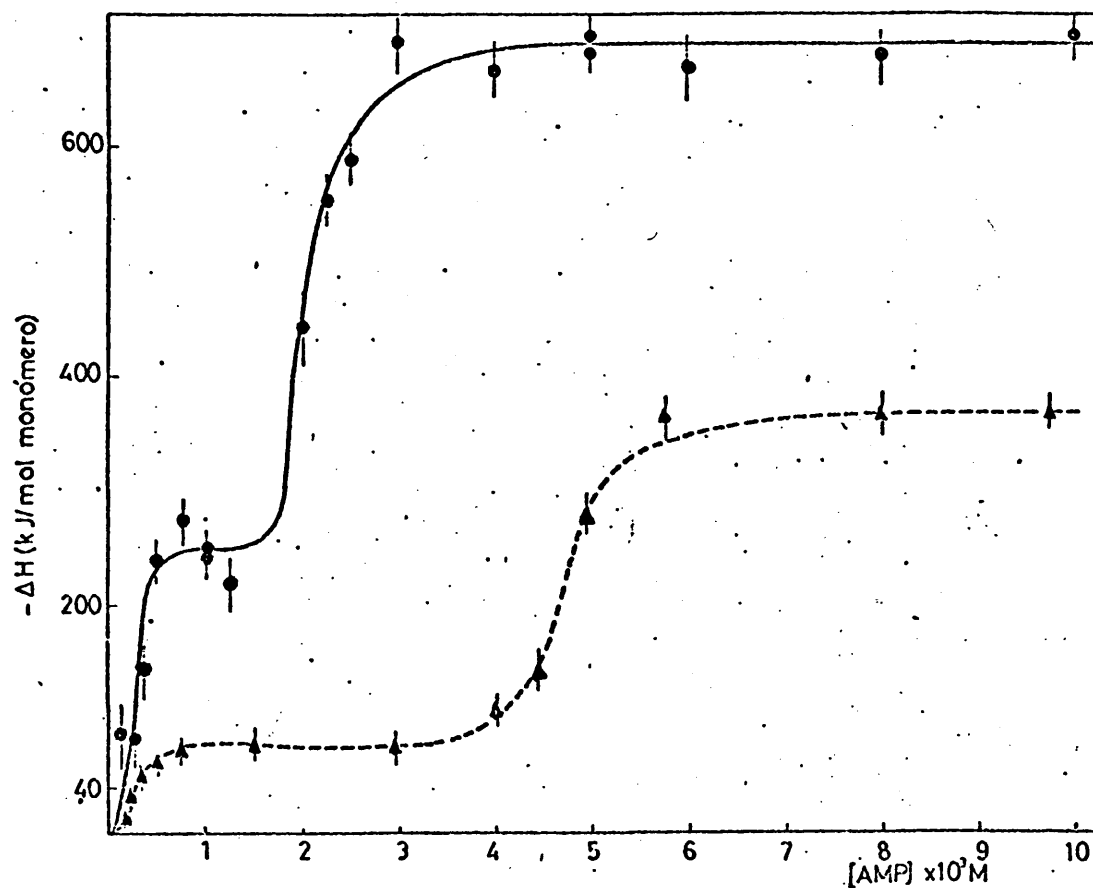


Fig.18. Valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP a 25°C
 — Ph b = 1 mg/ml. - - - - - Ph b = 2.66 mg/ml.

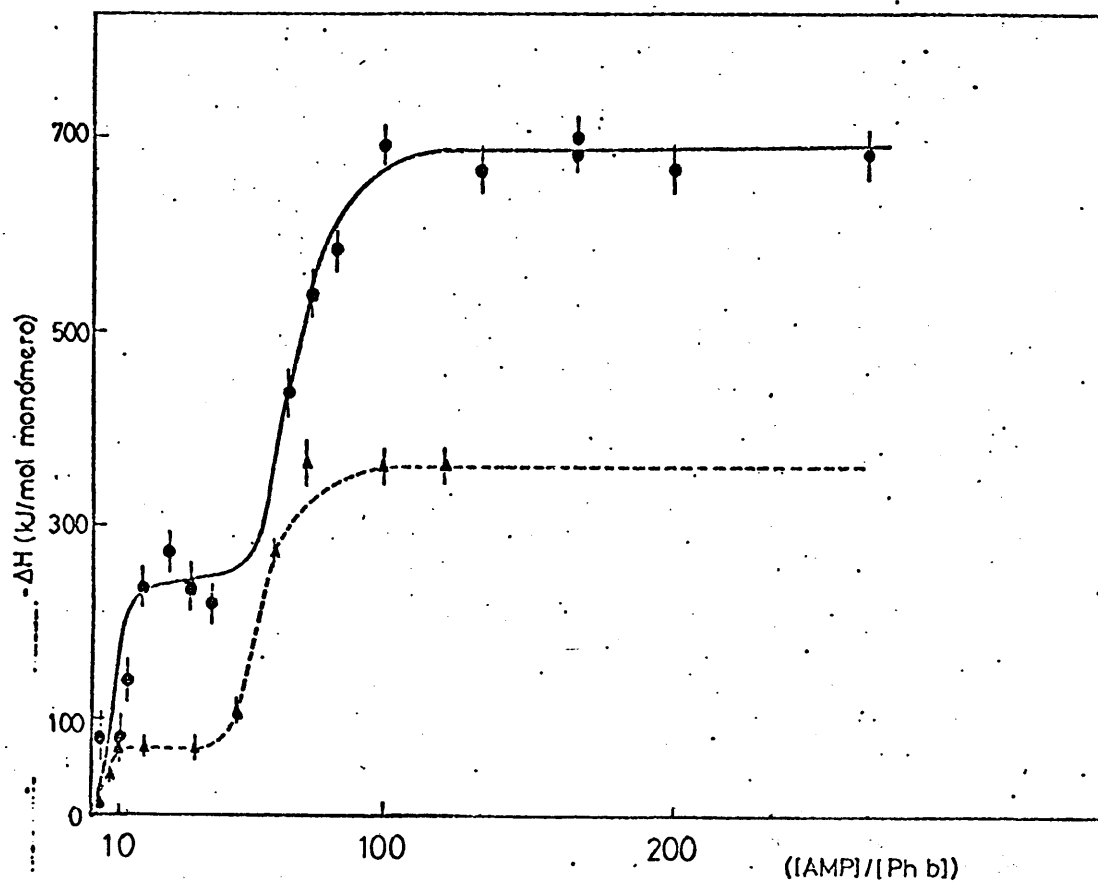


Fig.19. - Representación de los datos de la fig.18 en función de la relación $[AMP]/[Ph\ b]$.

La fig. 20 muestra los resultados obtenidos al estudiar la interacción AMP-fosforilasa en función de la concentración de enzima, variando ésta desde 0,25 mg/ml hasta 5.0 mg/ml; permaneciendo siempre la relación de moléculas AMP/moléculas de enzima a saturación del 2º sitio. La gráfica muestra todas las características de una transición conformacional entre dos estados enzimáticos.

A partir de las pendientes de las rectas, se obtiene un cambio entálpico de $-(690 \pm 25) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ para una concentración enzimática menor o igual a 1.5 mg/ml y de $-(361 \pm 10) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$ para valores superiores a 2,6 mg/ml. A partir de estos valores se obtienen una diferencia entálpica de interacción con los dos estados de $+(329 \pm 30) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$. Este valor incluye también la entalpía de tetramerización ya que a concentraciones de enzima superiores a 2,6 mg/ml y AMP 10^{-2} , la fosforilasa se encuentra completamente en forma tetramérica y a concentraciones inferiores a 1,8 mg/ml en forma dimérica, ya que la enzima migra en un pico simétrico de $(9,1 \pm 0,1)S$ en presencia de AMP $10^{-2}M$ a 25°C. Este valor es el mismo que se obtiene a 25°C para la enzima en tampón glygly en ausencia de AMP a concentraciones inferiores a 1,8 mg/ml. Por tanto, el valor obtenido para la entalpía de la interacción fosforilasa b -AMP ($10^{-2}M$) a concentraciones inferiores a 1,5 mg/ml, ha de ser debido a la unión de AMP a la enzima y al cambio conformacional inducido en ella.

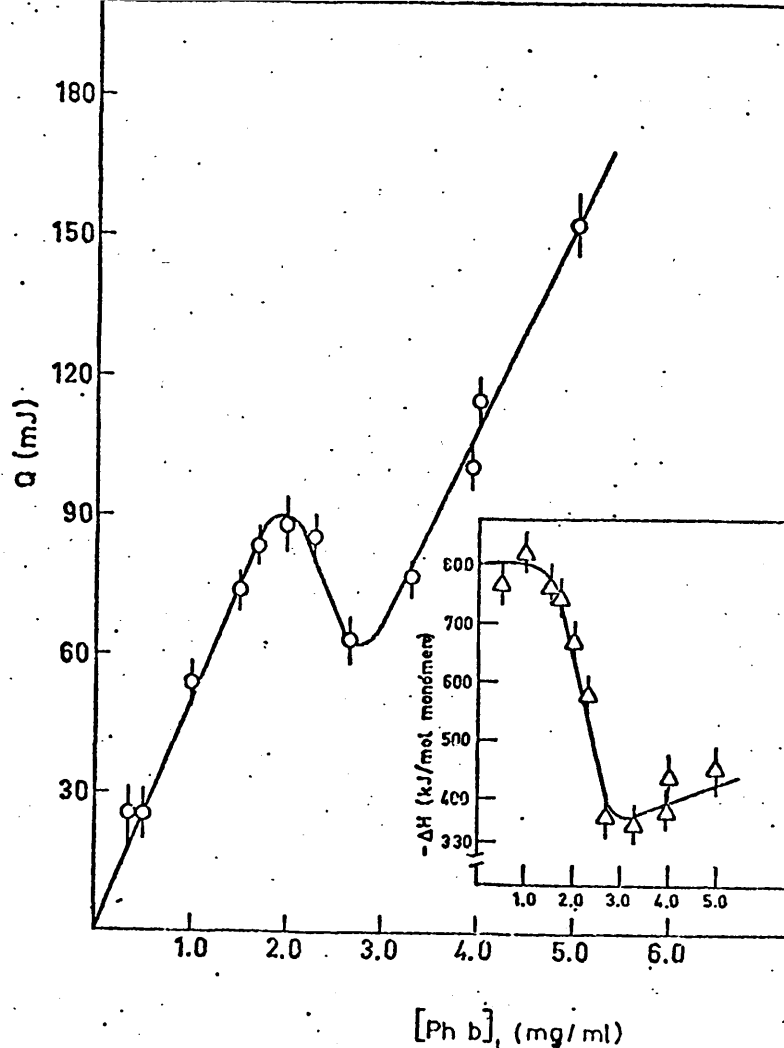


Fig.20. - Variación del calor de interacción fosforilasa b-AMP $10^{-2}M$ en función de la concentración de enzima. Recuadro: Variación entálpica de la interacción anterior.

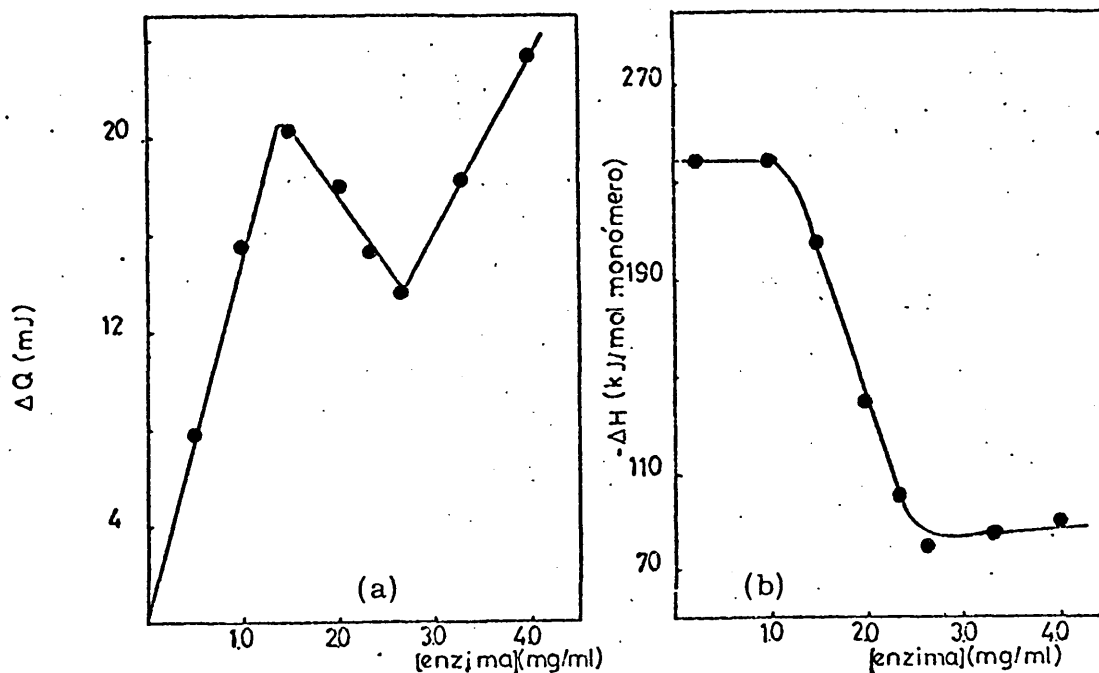


Fig.21. - a) Variación del calor de interacción fosforilasa b-AMP $10^{-3}M$ en función de la concentración de enzima. b) Variación de la entalpia de la interacción anterior.

En la fig. 21 (a y b) se han representado los valores entálpicos de la interacción AMP-fosforilasa b, obtenidos a una concentración de AMP correspondiente a la primera meseta de la curva de valoración entálpica (AMP/sitio = 90), en función de la concentración de enzima. Puede observarse una discontinuidad en el mismo intervalo de concentración de enzima que la obtenida para la interacción fosforilasa b -AMP ($10^{-2}M$), fig. 20. Así, pues, el cambio conformacional detectado en la enzima afecta también al sitio de unión de mayor afinidad hacia AMP en el monómero. No obstante, la diferencia de entalpía entre ambos estados (171 ± 16) kJ (mol monómero) $^{-1}$ difiere claramente de la obtenida en presencia de AMP $10^{-2}M$. Para comprobar si en este valor hay aportaciones debidas a cambios en el estado de agregación de la enzima se realizaron diversos experimentos de ultracentrifugación que condujeron a los siguientes resultados:

- a) La enzima a 1,0 mg/ml, en presencia de AMP $10^{-3}M$ a 25°C, migra en un solo pico simétrico de ($9,1 \pm 0,1$) S, dímero.
- b) En las mismas condiciones anteriores, pero a concentraciones de enzima de 2,67 y 5,0 mg/ml, se observan dos picos, uno mayor con un coeficiente de sedimentación de 8,4S (dímero) y otro, que lleva alrededor de un 5% del total de enzima de 13,2S (tetrámero).

El pequeño porcentaje de tetrámero presente a concentraciones de enzima mayores o iguales de 2,67 mg/ml y totalmente ausente a una concentración de 1,5 mg/ml, corrobora los da-

tos de ultracentrifugación obtenidos en presencia de AMP $10^{-2}M$ que indican la desaparición de la capacidad de tetramerización de la fosforilasa b por debajo de (1.5 - 1.7) mg/ml .

Por otra parte, estudios de valoración de las "cisteínas lentas" de la fosforilasa b con DTNB muestran que las constantes de velocidad de éstas se ven fuertemente afectadas por la concentración enzimática. Así, a 1 mg/ml y 25°C, en presencia de AMP $6 \times 10^{-3}M$, se protegen dos "-SH" lentos por monómero, en tanto que a una concentración enzimática igual o superior a 2,67 mg/ml sólo es protegido un grupo "--SH" lento, permaneciendo idénticas las demás condiciones experimentales.

Con objeto de verificar si a bajas temperaturas ($< 16^{\circ}C$) se podía apreciar alguna diferencia en las propiedades de agregación de la fosforilasa b, que indicara que la transición detectada a 25°C tuviera lugar también a estas temperaturas se realizó el experimento que se describe a continuación, ante la imposibilidad práctica de realizar medidas calorimétricas a temperaturas del orden de los 4°C. A 4°C la enzima 4 mg/ml incubada con AMP ($10^{-3}M$) y Mg^{++} ($10^{-2}M$) cristaliza completamente en un plazo de 24 horas (43); sin embargo, en idénticas condiciones la enzima a 1.0 mg/ml no cristaliza. Puesto que la cristalización de la enzima parece requerir la tetramerización de la misma, es posible concluir que la transición conformacional dependiente de la concentración enzimá-

tica detectada a 25°C posiblemente ha de producirse también a bajas temperaturas (por debajo de la temperatura de la transición conformacional térmica).

En la fig. 22 se han representado los resultados obtenidos para la interacción fosforilasa b - fosfato (concentración saturante), en función de la concentración de enzima. Puede apreciarse la aparición de una discontinuidad entre concentraciones de enzima de : (1,5 - 2,5) mg/ml, similar a las obtenidas para la interacción AMP-fosforilasa b . Los experimentos de ultracentrifugación, realizados en presencia de fosfato saturante, $5 \times 10^{-2}M$, conducen a los siguientes resultados: a concentraciones de enzima iguales a 1,0 mg/ml y 2,67 mg/ml la especie enzimática predominante es la dimérica (8,6S), pero a 2,67 mg/ml aparece un pequeño porcentaje ($\geq 5\%$) que migra con un coeficiente de sedimentación de 13,2S (tetramero).

Los resultados expuestos hasta aquí, permiten inferir la existencia de una transición conformacional entre dos estados diméricos de la enzima dependiente de su concentración, pero no miden ninguna propiedad importante de la misma directamente. Por esta razón, se determinó la entalpía de dilución desde 4,0 mg/ml a 1,0 mg/ml de la enzima sola en tampón, obteniéndose un valor de $-(100 \pm 5) \text{ kJ (mol/monómero)}^{-1}$ que mide la separación energética entre los dos estados enzimáticos en glygly.

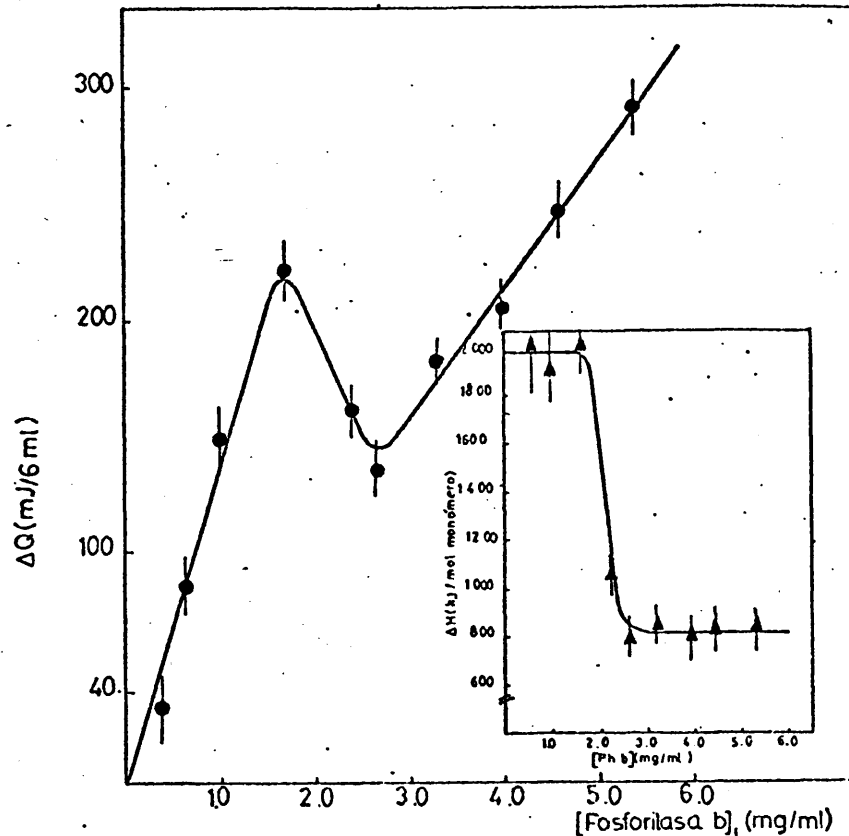


Fig.22. - Variación del calor de interacción fosforilasa b -fosfato $5 \times 10^{-2} M$ en función de la concentración de enzima. Recuadro: Variación entálpica de la interacción anterior.

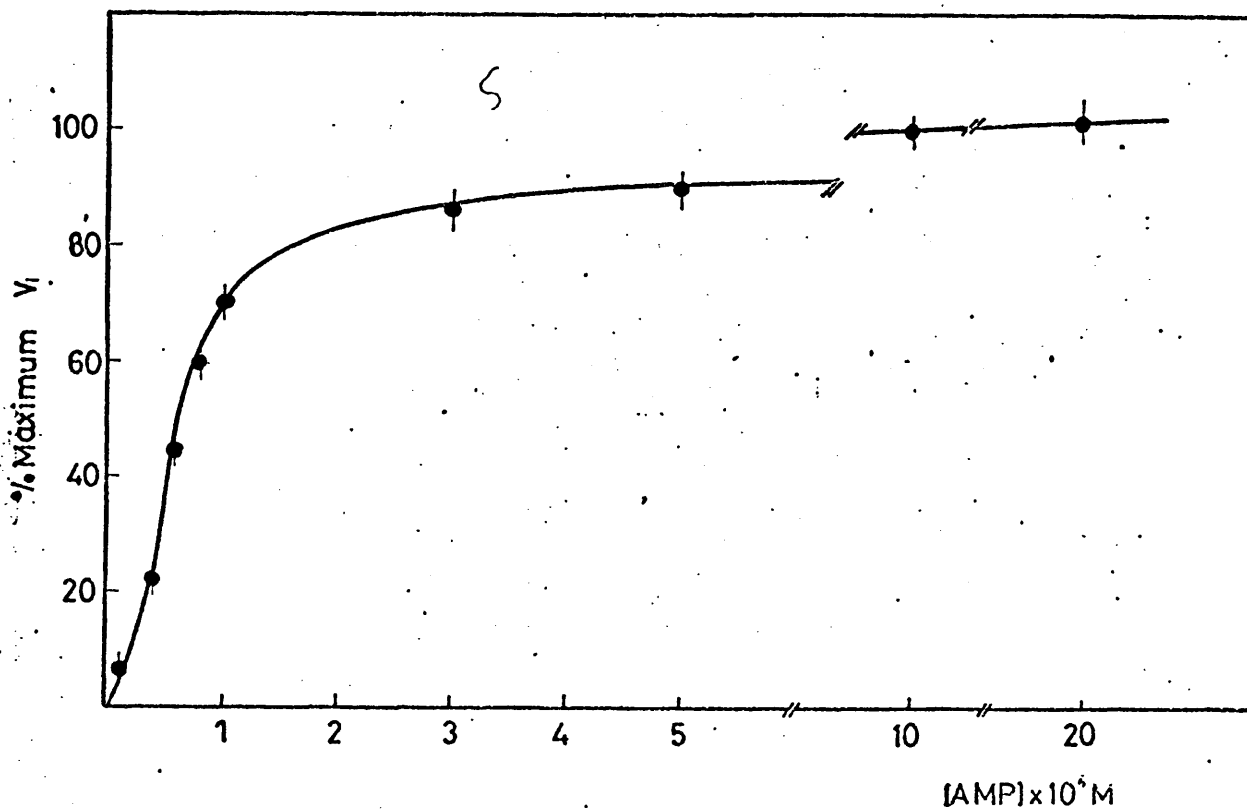


Fig.23. - Curva de activación de la fosfarilasa b por AMP a 25°C.

Discusión

La curva de valoración entálpica de la fosforilasa b (2,67 mg/ml) a 25°C con AMP puede comprenderse considerando el esquema conformacional propuesto por Buc y col.(99). Sin embargo, a concentraciones de enzima inferiores a 1.5 mg/ml, este esquema no puede explicar el comportamiento de la fosforilasa b, ya que el tetrámero no se halla presente ni aún en las condiciones más favorables para que ello ocurra. Puesto que es el estado dimérico E_3 el que permite la tetramerización inducida por AMP de la fosforilasa b este estado no ha de alcanzarse a bajas concentraciones de enzima (< 1.5 mg/ml). Por otra parte la explicación de la curva de valoración de la fosforilasa b (1.0 mg/ml) por AMP a 25°C exige, sólo, la existencia de tres estados conformacionales enzimáticos en equilibrio.

En la tabla III se han recopilado los resultados obtenidos de las figuras 18,20,21 y 22; asimismo en ella se incluyen los resultados de las figuras 13, 14 y 15 juntamente con los coeficientes de sedimentación obtenidos.

Esta tabla muestra las grandes diferencias existentes en las entalpías de interacción fosfato-fosforilasa b y AMP-fosforilasa b, ésta última en ambas mesetas, por encima y por debajo del intervalo de concentración enzimática de transición. Como se analizó al exponer los resultados de

TABLA III

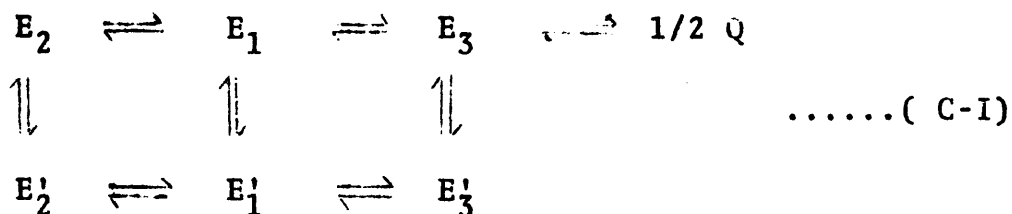
Entalpias de interacción de la fosforilasa b con AMP y Pi. Coeficientes de sedimentación

	[Fosforilasa b]			
	<1.7 mg/ml		2.6 - 5 mg/ml	
	$-\Delta H$ kJ (mol monómero) ⁻¹	Coef. Sed. S	$-\Delta H$ kJ (mol monómero) ⁻¹	Coef. Sed. S
AMP 10 ⁻³ M, 25°C	248 ± 8	9,1	77 ± 2	[8,4 5% 13,2
AMP 10 ⁻² M, 25°C	690 ± 25	9,1	361 ± 25	13,2
AMP 10 ⁻³ M, 21°C	-	-	247 ± 20	9,1
AMP 10 ⁻² M, 21°C	-	-	730 ± 55	13,2
Fosfato 5x10 ⁻² M, 25°C	1.980 ± 174	8,6	830 ± 72	[8,6 5% 13,2
Fosfato 5x10 ⁻² M, 21°C	-	-	2.600 ± 200	[8,6 10% 13,2

este apartado, estas diferencias han de ser atribuidas, en su mayor parte, en el caso de AMP, a los diferentes cambios conformacionales producidos por la transición enzimática. La gran diferencia entre las entalpías de interacción del fosfato al unirse a los dos diferentes estados enzimáticos, puede deberse a la aparición de algunas zonas de la superficie enzimática capaces de interaccionar con el fosfato, es decir, cargados positivamente, dado el carácter inespecífico de su interacción con la enzima.

Según se ha comentado en el capítulo anterior, a 25°C, el fosfato estabiliza el estado conformacional E_3 , en tanto que AMP $10^{-3}M$ desplaza a la enzima hacia E_1 y AMP $10^{-2}M$ la tetrameriza completamente, previo desplazamiento de la fosforilasa b hacia E_3 . Ho y Wang (17) trabajando en tampón glicerofosfato no detectaron la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima, posiblemente porque la acción del glicerofosfato es muy similar a la del fosfato; es decir, desplaza a la enzima hacia el estado E_3 , el hecho experimental señalado puede ser interpretado como que el fosfato induce la formación de E_3 cualquiera que sea la concentración de enzima.

Basándonos en las anteriores consideraciones, el mínimo esquema conformacional para la fosforilasa b a 25°C compatible con ellas, es decir, el mínimo de estados conformacionales inducibles por AMP y fosfato es :

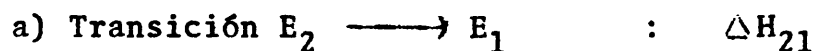


en donde se ha respetado la nomenclatura propuesta por Buc y col. (99). Los estados conformacionales señalados con primas (E'_2 , E'_1 y E'_3) son los alcanzados por la enzima a concentraciones inferiores a 1.5 mg/ml en ausencia de todo ligando (E'_2), en presencia de AMP $10^{-3}M$ (E'_1) y en presencia de AMP $10^{-2}M$ (E'_3).

Los estados E'_3 (que bloquean la tetramerización de la fosforilasa b) y E'_2 y E'_1 , presentan un coeficiente de sedimentación igual a $(9.1 \pm 0.1)S$ a $25^\circ C$, al igual que los estados diméricos a los que lleva AMP2' y AMP3', como se verá más adelante, y diferente al que poseen los estados diméricos E_2 , E_1 (8.3-8.4S) o E_3 (8.6S). El estado E'_3 posiblemente sea, pues, inactivo ya que los nucleótidos citados son inhibidores de la pequeña actividad residual en ausencia de AMP que presenta la fosforilasa b.

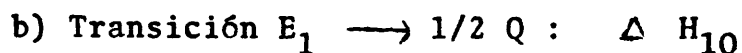
A partir de los resultados de la tabla III pueden evaluarse las magnitudes entálpicas aproximadas asociadas a las transiciones conformacionales del esquema propuesto (C-1). Para ello haremos la suposición de que la entalpía de interacción directa AMP-fosforilasa b es constante o aproximadamente constante, sea cual sea el estado conformacional al que se una

el activador alostérico. Haciendo uso de que el número de sitios de unión de mayor y menor afinidad hacia AMP, por monómero, es uno, pueden estimarse las siguientes entalpías de transición:



Se estima como el valor entálpico de la primera meseta de la curva de valoración de la fosforilasa b (2,67 mg/ml) por AMP a 25°C. Naturalmente, este valor de ΔH_{21} es solamente aproximado, debido a que la unión de AMP a la enzima provoca un cambio conformacional en la enzima, midiéndose, por tanto, la suma de dos entalpías $(^{(1)} \Delta H_b$ y $(^{(1)} \Delta H_t$ - véase el apartado IV-4) que es imposible separar con datos presentados en este estudio. No obstante, el valor de la entalpía directa de unión $(^{(1)} \Delta H_b)$ ha sido estimado en aproximadamente - (8-10)kJ (mol monómero) (17), cantidad poco importante ante las magnitudes entálpicas obtenidas, casi dentro del error experimental de las mismas. Por tanto:

$$\Delta H_{21} = -(77 \pm 2) \text{ kJ (mol monómero)}^{-1}$$



Este incremento entálpico, ΔH_{1Q} , se estima como la diferencia entre las dos mesetas de la curva dada en la fig.7

(concentración de enzima = 2,67 mg/ml) :

$$\Delta H_{1Q} = - (284 \pm 4) \text{ kJ/mol monómero}$$

En este caso el valor de la entalpía de unión de AMP a la enzima (ΔH_b) se anularía por hallarse englobada en ambos sumandos.

c) Tránsito $E_2' \longrightarrow E_1'$: $\Delta H_{21}'$

Se obtiene de forma análoga al caso (b), pero utilizando la curva de valoración entálpica por AMP a concentración de enzima de 1 mg/ml.

$$\Delta H_{21}' = - (248 \pm 8) \text{ kJ/mol monómero}$$

d) Transición $E_1' \longrightarrow E_3'$: $\Delta H_{13}'$

El valor de $\Delta H_{13}'$ será la diferencia entre las dos mesetas de la curva de valoración entálpica por AMP a una concentración de enzima de 1 mg/ml.

$$\Delta H_{13}' = - (442 \pm 17) \text{ kJ/mol monómero}$$

e) Transición $E_2 \longrightarrow E_2'$: $\Delta H_{22}'$

Se obtuvo por medida directa, según se indicó anteriormente:

$$\Delta H_{22}' = - (100 \pm 5) \text{ kJ/mol monómero}$$

f) Transición $E_3 \longrightarrow 1/2Q$: ΔH_{3Q}

A partir solamente de los datos dados previamente no puede estimarse. Sin embargo, en la bibliografía se halla el valor de la entalpía de transición $E_1 \longrightarrow E_3$, obtenido a partir de medidas de relajación térmica, $\Delta H_{13} = (46 \pm 4)$ kJ/mol monómero (88). Utilizando este dato, y el valor de ΔH_{1Q} calculado en el párrafo (b) se obtiene un valor de ΔH_{3Q} :

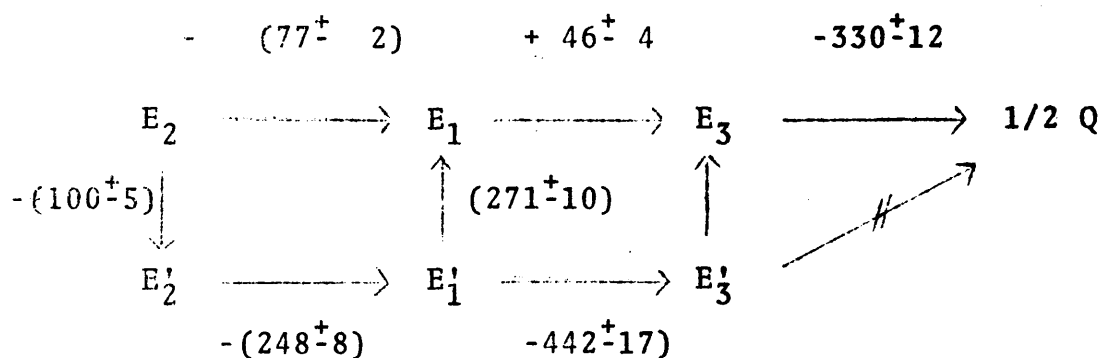
$$\Delta H_{3Q} = 330 \pm 12 \text{ kJ/mol monómero}$$

g) Transición $E'_1 \longrightarrow E_1$: $\Delta H_{1'1}$

A partir de los datos anteriores se estima un valor:

$$\Delta H_{1'1} = (271 \pm 10) \text{ kJ/mol monómero}$$

El esquema conformacional C-I queda como sigue:



en donde con el símbolo $E'_3 \nrightarrow 1/2Q$ se quiere indicar que esta transición se halla bloqueada. Según puede apreciarse en el esquema anterior son endotérmicas las transiciones que con-

ducen a E_3 desde E_1 y E_1' y la que conduce a E_1 desde E_1' .

Los elevados cambios entálpicos medidos podrían ser debidos, en gran parte, a la formación o ruptura de puentes disulfuro, cuya entalpía de formación es de $-(286 \pm 4)$ kJ (mol S-S)⁻¹ (112). Esta hipótesis concuerda con los resultados de valoración de grupos "cisteína lentos" comentados en este apartado. Una evaluación más detallada de los cambios entálpicos, atribuyéndolas a las distintas causas que contribuyen al valor entálpico total (ionización de distintos grupos químicos, transferencia de grupos desde un medio a otro, etc), no es posible sin conocer los aminoácidos implicados directamente en el proceso de unión de AMP a la enzima y en los cambios conformacionales asociados a ella. No obstante, dada la aparente importancia de los grupos -SH en estas transiciones, puede pensarse que la entalpía de la transición $E_1 \rightarrow E_3$ es debida a la ionización de un grupo -SH por monómero, ya que la entalpía de ionización de este grupo es igual a (41 ± 1) kJ/mol.

Según dijimos anteriormente la saturación entálpica de la primera clase de sitios requiere (30-34) moléculas AMP/sitio y la segunda clase de sitios: (270-300) moléculas AMP/sitio. No obstante, estos son valores que dan idea de la afinidad global del sistema enzimático hacia AMP, en sus dos clases de sitios de unión, pero nada dicen acerca de la afinidad de los estados conformacionales a los cuales

se une AMP, E_1 (primera clase de sitios) y E_3 (segunda clase de sitios). Las afinidades de estos estados enzimáticos hacia AMP pueden estimarse a partir de las constantes de disociación $^{(1)}K_r$ y $^{(2)}K_r$, $3,0 \cdot 10^{-5}M$ y $6.5 \times 10^{-4}M$, respectivamente, cuya determinación se hizo en el apartado 4-IV, para una concentración de enzima constante e igual a 2,67 mg/ml ($2.9 \times 10^{-5}M$, en moles de monómero de enzima). La afinidad de ambas clases de sitios hacia AMP se refleja en la relación $K_r / 1/2$ (sitios), puesto que la constante de disociación es igual a la concentración de ligando precisa para saturar el 50% de los sitios de unión asequibles. De este modo se obtiene que el primer sitio (estado E_1) requiere aproximadamente dos moléculas AMP/sitio, en tanto que el segundo sitio (estado E_3) precisa 45 moléculas AMP/sitio para saturarlos.

Hasta ahora se ha rechazado toda implicación de los sitios de menor afinidad hacia AMP en el proceso catalítico, debido a las altas concentraciones de AMP necesarias para su saturación, concentraciones que no son fisiológicas ni, por otra parte, afectan apreciablemente la actividad catalítica, cuyo máximo valor se alcanza (en cinéticas de activación) a valores de concentración de AMP del orden de las precisas para saturar la primera clase de sitios de unión. En la fig. 23 se da la curva cinética de activación de la fosforilasa b (10^{-2} mg/ml) por AMP a $(25.0 \pm 0,2)^\circ C$ en tampón glygly (véanse métodos). En ella puede apreciarse que

el comienzo de la activación tiene lugar a una concentración de AMP entre $(0.5-1.0) \times 10^{-4}M$ que corresponde a una relación de 450-900 moléculas AMP/sitio (considerando un solo sitio por monómero). Por otra parte, el comienzo del efecto entálpico asociado a la saturación de la clase de sitios de menor afinidad hacia AMP (fig.19) tiene lugar entre (100-120) moléculas AMP/sitio. Considerando las conclusiones expuestas en el párrafo anterior es lógico concluir que el sitio de menor afinidad hacia AMP está implicado en el proceso catalítico. Son, pues, los estados E_3 y Q los que han de poseer una actividad catalítica elevada. El estado E_1' (puesto que las cinéticas se realizan a una concentración de enzima $< 1,5$ mg/ml) sólo actuaría posibilitando el desplazamiento hacia E_3 y Q, actuando, por tanto, los sitios de mayor afinidad hacia AMP de modo exclusivamente regulador. Es preciso señalar que el estado E_3' no se ha de alcanzar en los estudios cinéticos puesto que el fosfato, al desplazar el equilibrio conformacional hacia E_3 , bloquearía esta posible vía conformacional. Estas conclusiones concuerdan con los resultados expuestos previamente en los que podía apreciarse que es el sitio de menos afinidad hacia AMP el que se ve más drásticamente afectado por la presencia de los sustratos: glucógeno y fosfato.

En resumen, la concentración de enzima induce en la fosforilasa b un cambio conformacional que, sin alterar

el estado de agregación enzimático, afecta a las propiedades de la fosforilasa b con respecto a sus características de control por el activador alostérico: AMP. Es la primera vez que tal tipo de transición se detecta en un sistema enzimático y una reconsideración de algunas conclusiones sobre la fosforilasa b realizadas por otros investigadores (16), al comparar resultados obtenidos por diferentes técnicas, permite una distinta explicación de los mismos.

Puesto que la concentración de la fosforilasa b en el músculo ha de ser del orden de 1 mg/ml e incluso superior a veces, ya que se obtienen 1.5 gr. de enzima/2 kg de carne y la concentración de fosforilasa b en la fracción particulada de glucógeno es del orden de 7 mg/ml (26), esta transición podría desempeñar un papel aún por comprender con toda exactitud. En principio, sin embargo, puede considerarse, muy simplificada, como la eliminación de una vía conformacional muy probablemente inactiva. Si ésta fuera la función fisiológica de esta transición (cuestión aún muy especulativa) el metabolismo energético de la célula muscular se vería fuertemente afectado, dada la gran importancia que en éste posee la primera etapa de la degradación del glucógeno.

Al comparar los valores de la entalpía global medida para las transiciones dependientes de la concentración de enzima (en presencia de AMP, a saturación de ambas clases

de sitios, y de fosfato) con los valores de ΔH_{P_i} estimados a partir de las fig. 13, 14 y 15 para las transiciones observadas en función de la temperatura se observa que coinciden, dentro de los márgenes del error experimental.

Estos hechos muestran que las dos variables :
concentración de enzima y temperatura, actúan sorprendentemente de manera muy similar sobre la fosforilasa b , en los intervalos en que han sido estudiados.

CAPITULO VI

C A P I T U L O V I

ESPECIFICIDAD ESTRUCTURAL EN LA INTERACCION AMP-FOSFORILA-

SA B

1. Introducción : Conocimiento actual del tema

En un estudio cinético Okazaki y col. (113) examinaron las propiedades de activación o inhibición de la fosforilasa b para una serie de compuestos derivados de la molécula de AMP por modificación química de alguno o algunos de sus grupos (análogos de AMP). Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

a) Los análogos de AMP que difieren en el anillo de la base púrica: activan todos ellos a la enzima, sin embargo la unión se ve afectada por la sustitución del grupo amino en el C(6) del anillo de adenina. Postulan que la interacción de este grupo amino con la enzima pudiera realizarse a través de un puente de hidrógeno en el que se hallara implicado el par electrónico sin compartir del átomo de nitrógeno.

Asimismo, concluyen que el N(1) de la adenina y el anillo imidazólico de la base púrica se hallan implicados en la unión de AMP a la enzima.

b) Utilizando análogos de AMP modificados en el grupo fosfato concluyeron que la presencia y posición de este grupo es esencial para la activación de la enzima. La disminución en la activación máxima inducida por la adenosina-5'-fosforamidato (en el que el grupo fosfato modificado es monoanión a pH = 6.9) en la enzima respecto de la inducida por AMP (en el que el grupo fosfato es dianión a pH = 6.9) se atribuyó a la importancia de las interacciones electrostáticas fosfato-enzima.

c) Estudios con análogos en ribosa y base, permitieron concluir la gran importancia que el grupo -OH en el átomo de carbono 2' de la ribosa posee en el proceso de unión a la enzima y activación subsiguiente, así como el débil efecto que la eliminación del grupo -OH en -3' de la ribosa ejerce sobre ambos procesos.

Paralelamente a Okazaki y col., Black y Wang (114) y Mott y Bieber (115) realizaron estudios cinéticos similares en el sentido de biosíntesis de glucógeno, obteniendo conclusiones concordantes con las comentadas previamente. Black y Wang postulan que, en virtud de la gradación de propiedades catalíticas de la fosforilasa b según el nucleótido análogo de AMP utilizado para su activación, el comportamiento de la fosforilasa podría ser descrito por el modelo de Koshland suponiendo que los nucleótidos pueden inducir "diferentes estados conformacionales" intermedios entre el

de la enzima sola y el que induce AMP en la misma.

Anderson y Graves (95,96) han mostrado la naturaleza hidrofóbica del sitio o sitios de unión de la molécula de AMP a la enzima, confirmando la hipótesis de Okazaki y col. (113) sobre la alta afinidad de la enzima hacia la base púrica del nucleótido.

No obstante, estos estudios con análogos de AMP adolecen de dos defectos:

- a) Desde hace relativamente poco tiempo es conocida la existencia de dos clases de sitios de unión para AMP, de diferente afinidad en la fosforilasa b (16,17,101). Estos estudios cinéticos no permiten decidir a qué tipo de sitios hacen referencia las propiedades medidas, que por consiguiente han de entenderse como magnitudes fenomenológicas globales.
- b) Como es conocido (8) la activación por IMP sigue diferente mecanismo que la activación por AMP. En un reciente estudio con análogos de AMP (18, 69) se ha establecido que estos compuestos pueden clasificarse en dos clases, tipo AMP y tipo IMP, según que su actuación estructural sobre la enzima sea similar a uno u otro nucleótido.

Helmreich y col. (116) establecieron que el efecto del ión Mg^{++} sobre la acción catalítica se ejercía alterando la constante de unión de AMP a la enzima. Sugirieron que tal acción tendría lugar previa formación del complejo ternario : $(Mg^{++} \text{Enzima-AMP})$ y no a través de la formación del

complejo ($\text{AMP} \cdot \text{Mg}^{++}$) que interaccionara posteriormente con la enzima.

Danchin y Buc (117) por RMN, utilizando M_n^{++} en lugar de M_g^{++} , concluyeron que el sitio del activador alostérico se halla fuertemente inmovilizado una vez que se une a él la molécula de AMP. Esta situación favorece probablemente interacciones de larga distancia. Nada se sabe, sin embargo, sobre la flexibilidad del "sitio" de unión de AMP vacío. En otro estudio estos investigadores (118) utilizando Co^{3+} en lugar de M_n^{++} comprobaron la gran importancia de la carga y tamaño del ión en la actividad catalítica, efectos cooperativos y de agregación en la fosforilasa b.

2. Estudios con nucleótidos análogos de AMP

Para una mejor discusión de los resultados se han dividido en dos grupos:

A) Resultados obtenidos utilizando nucleótidos análogos de AMP, activadores fuertes de la fosforilasa b.

B) Resultados obtenidos con aquellos nucleótidos análogos de AMP que, o bien son activadores débiles o bien son inhibidores de la fosforilasa b.

A su vez, cada apartado (A y B) se ha dividido en dos: (I) exposición de los resultados cinéticos y su discusión parcial y (II) exposición de los resultados microcalorimétricos, de diálisis en el equilibrio y de ultracentrifugación.

gación y discusión general.

A) Acción de los análogos de AMP que son activadores fuertes de la enzima.

Se han estudiado los siguientes análogos: N_6 metilAMP, 6-cloro-purina-ribósido-5'-fosfato (6ClPRP) - y 1-N-metil-AMP, completándose con los datos precisos de AMP para realizar el estudio comparado de todos ellos (incluido AMP). Asimismo, se ha realizado un estudio microcalorimétrico de IMP.

I.- Resultados cinéticos

La Tabla IV muestra los valores de $K_{1/2}$ de activación obtenidos a partir de medidas de velocidad inicial del proceso catalítico a diferentes concentraciones de nucleótido a 25°C . Como valor de $K_{1/2}$ de activación se ha tomado la concentración de nucleótido precisa para producir la mitad de la activación máxima de cada nucleótido, referida al valor de la activación máxima inducida por AMP. Las curvas cinéticas sigmoideas presentan diversos grados de cooperatividad.

Los resultados representados en las fig. 24,25 y 26 muestran el efecto de la concentración de fosfato sobre el proceso de activación de los análogos de AMP citados. Estos resultados pueden interpretarse siguiendo el "modelo concertado" (12) suponiendo que la unión de los análogos

TABLA IV

Resultados cinéticos de la interacción fosforilasa b - nucleotido a 25°C

Nucleotido	Max. activ.	$k_{1/2}$ activ.	Cooperatividad $\times 10^5$ (a)
AMP	100	7.0×10^{-5}	4.00
N ⁶ metil AMP	85	7.0×10^{-5}	4.00
1-metil AMP	86	6.0×10^{-4}	0.55
6 ClPRP	80	2.0×10^{-4}	4.88

(a) El índice de cooperatividad se ha tomado como el cociente entre actividad máxima - actividad inicial $\times 100$ / actividad inicial \times el incremento de concentración correspondiente al cambio de actividad.

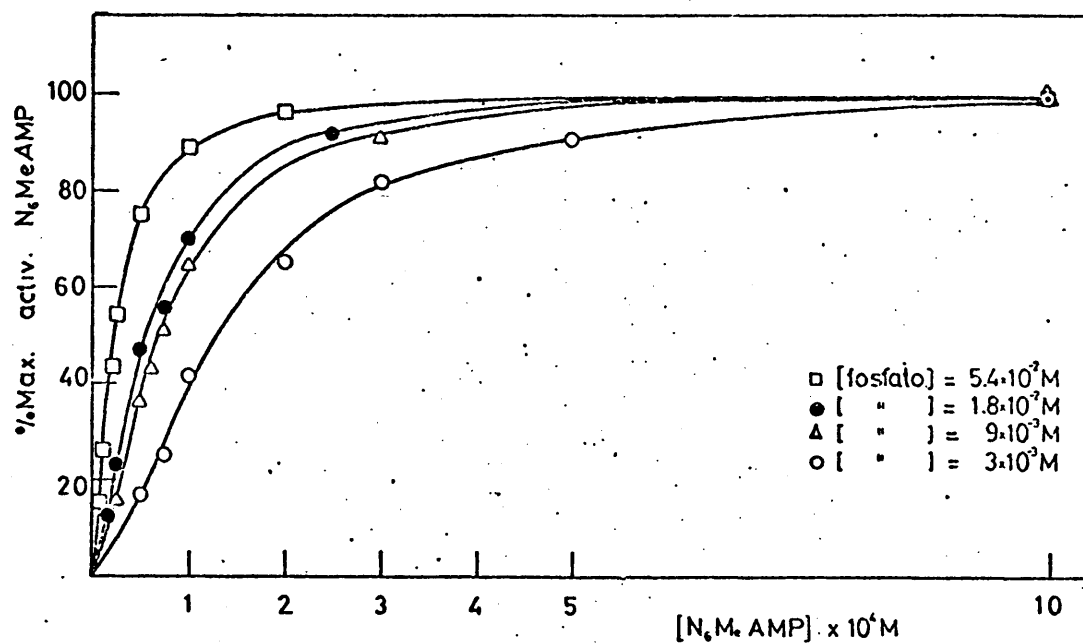


Fig.24. - Cinética de activación de la fosforilasa *b* por $N_6\text{MeAMP}$, en función de la concentración de fosfato, a 25°C .

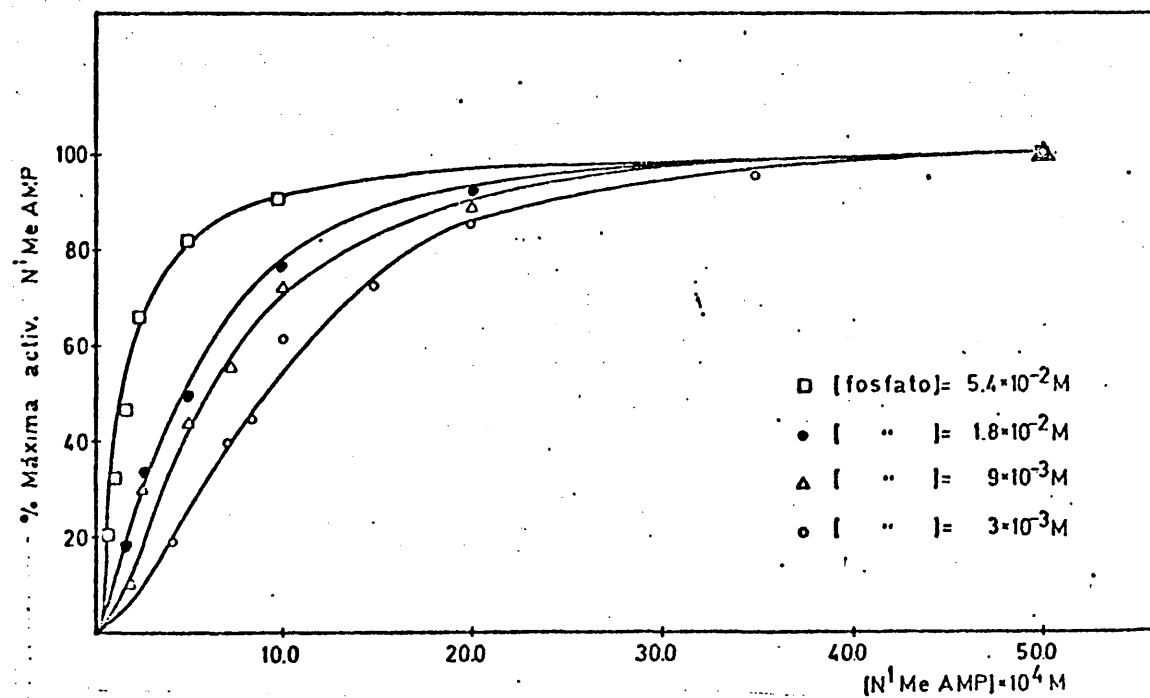


Fig.25. - Cinética de activación de la fosforilasa *b* por $N_1\text{MeAMP}$, en función de la concentración de fosfato, a 25°C .

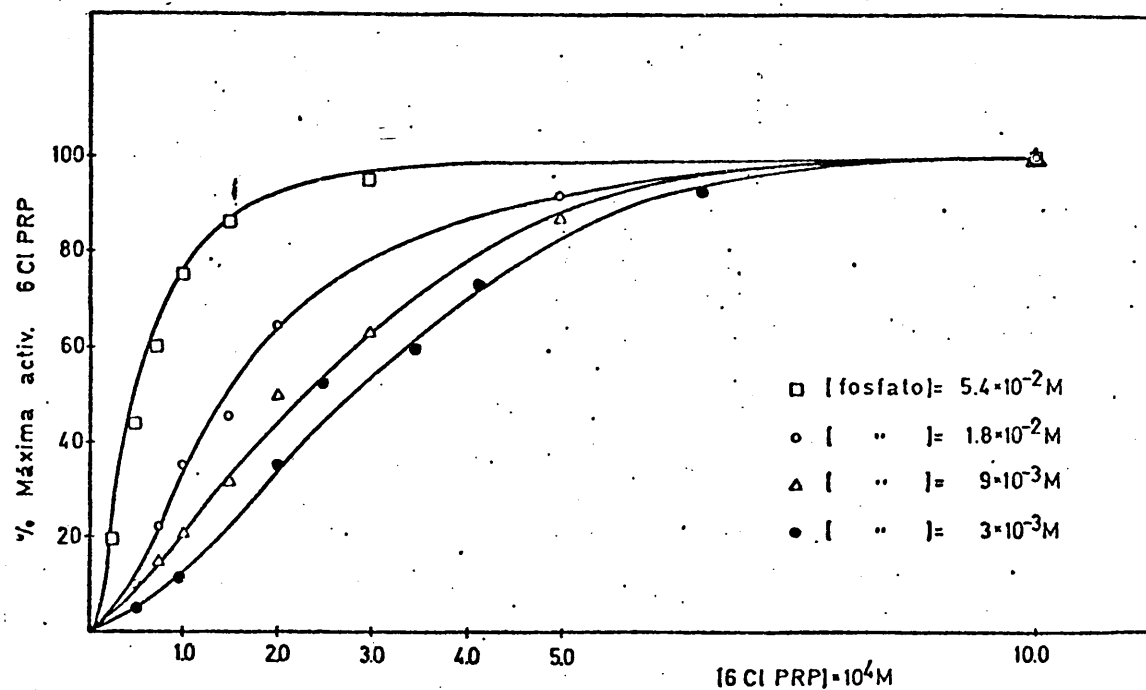


Fig. 26. - Cinética de activación de la fosforilasa b por 6ClPRP, en función de la concentración de fosfato, a 25°C.

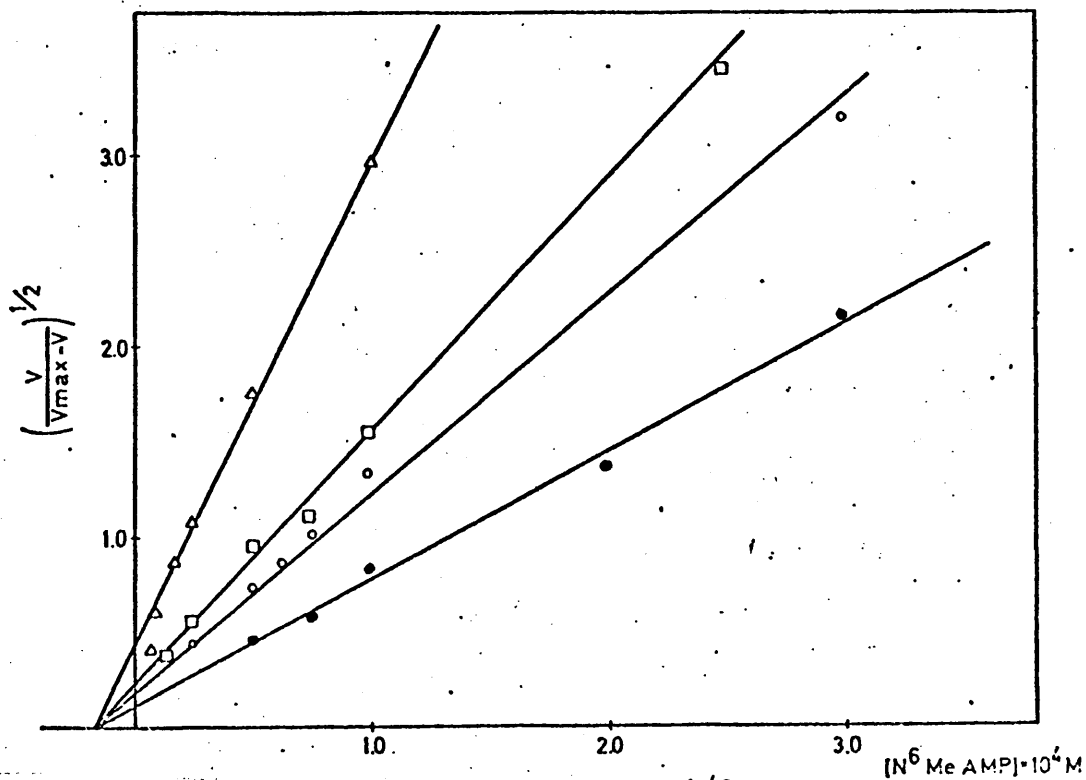


Fig. 27. - Representación de $(V/V_{\max} - V)^{1/2}$ en función de la concentración de $N^6\text{MeAMP}$, a diferentes concentraciones de fosfato, ●: $3 \times 10^{-3} M$, ○: $9 \times 10^{-3} M$, □: $1,8 \times 10^{-2} M$, △: $5,4 \times 10^{-2} M$.

de AMP a la enzima tiene lugar exclusivamente al estado R). Estos análogos presentan dos sitios de unión de alta afinidad por dímero, desplazan completamente a AMPC¹⁴ (69) y como demuestran las gráficas 24, 25 y 26 exhiben una alta cooperatividad homotrópica.

Las ecuaciones del "modelo concertado" pueden tratarse convenientemente para obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{V}{V_{\text{máx.}}} \cdot \frac{1}{V}^{1/2} = \left(\frac{1}{L_0} \right)^{1/2} \left(1 + \frac{(P)}{k_p} \right) \left(1 + \frac{(A)}{k_a} \right)$$

que fue ya aplicada por Buc (78) al proceso de activación de la fosforilasa b por AMP. En ella los símbolos utilizados significan:

V : velocidad inicial de la reacción catalítica a una concentración dada de nucleótido (A) y de fosfato, (P).

V_{max} : máxima velocidad inicial (valor de saturación) de la reacción a una concentración dada de fosfato.

L₀ : constante de equilibrio transconformacional entre las dos formas de la enzima, la de mayor afinidad hacia el ligando (R) y la de menor afinidad (T), es decir : $L_0 = \frac{(R)}{(T)}$, en ausencia de ligando.

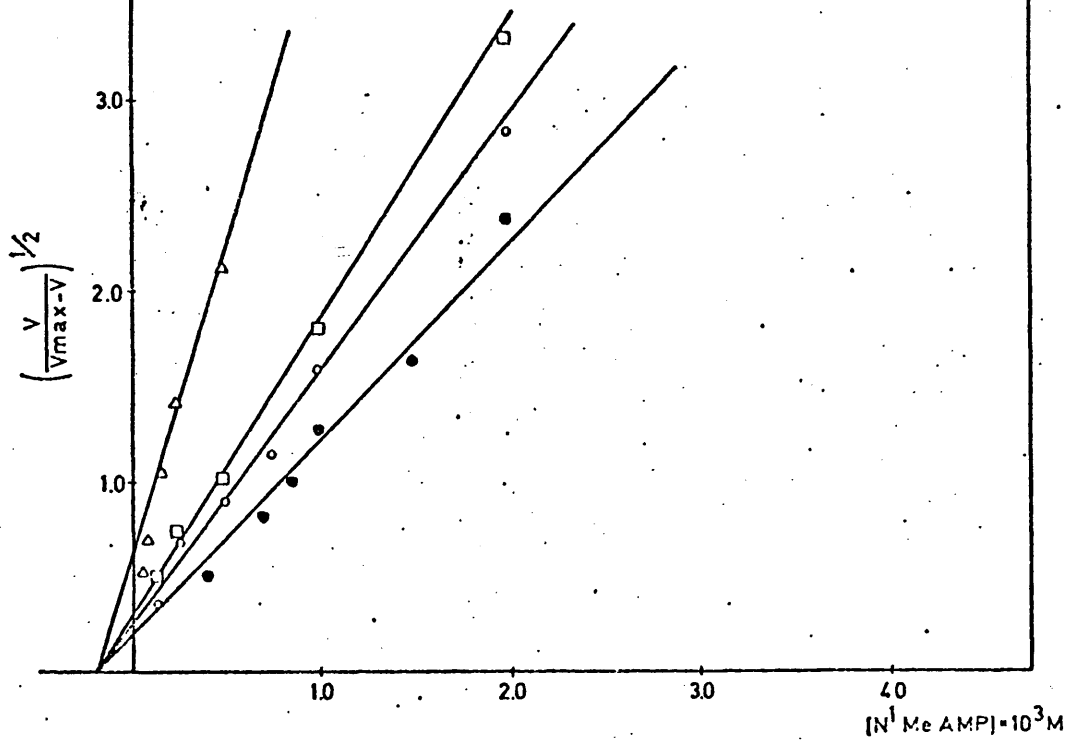


Fig. 28. - Representación de $(V/V_{\max} - V)^{1/2}$ en función de la concentración de $N^1\text{MeAMP}$ a diferentes concentraciones de fosfato, \bullet : $3 \times 10^{-3}\text{M}$, \circ : $9 \times 10^{-3}\text{M}$, \square : $1,8 \times 10^{-2}\text{M}$, \triangle : $5,4 \times 10^{-2}\text{M}$

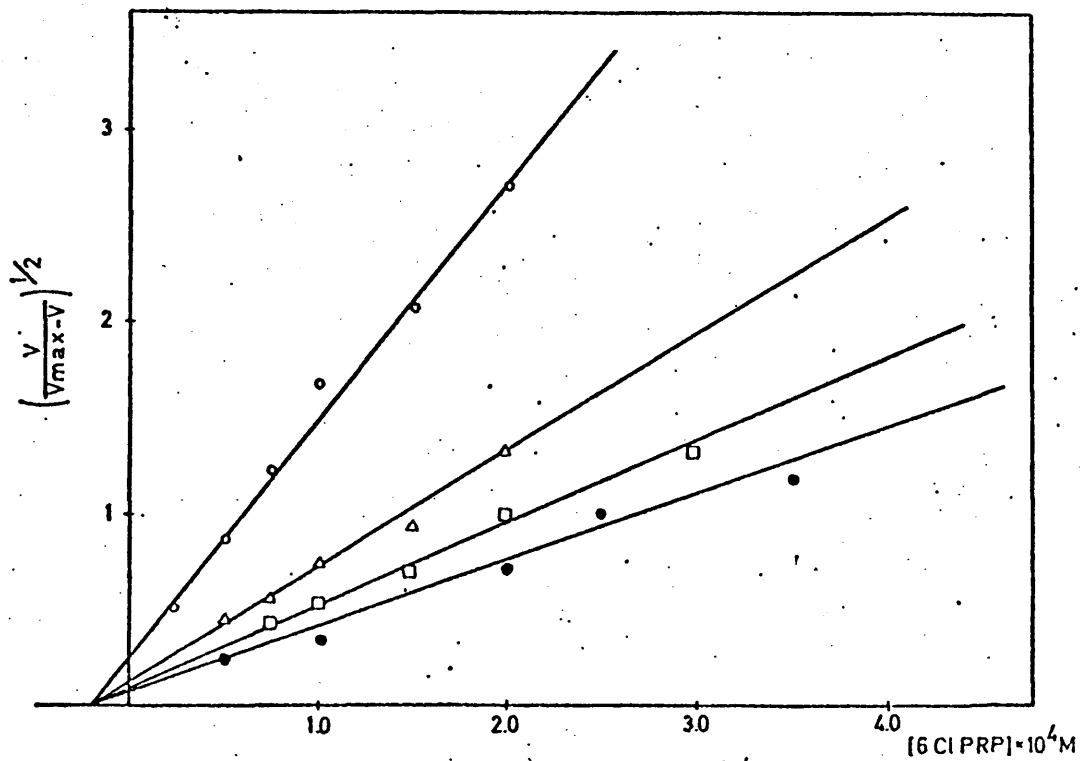


Fig. 29. - Representación de $(V/V_{\max} - V)^{1/2}$ en función de la concentración de 6ClPRP a diferentes concentraciones de fosfato, \bullet : $3 \times 10^{-3}\text{M}$, \square : $9 \times 10^{-3}\text{M}$, \triangle : $1,8 \times 10^{-2}\text{M}$, \circ : $5,4 \times 10^{-2}\text{M}$

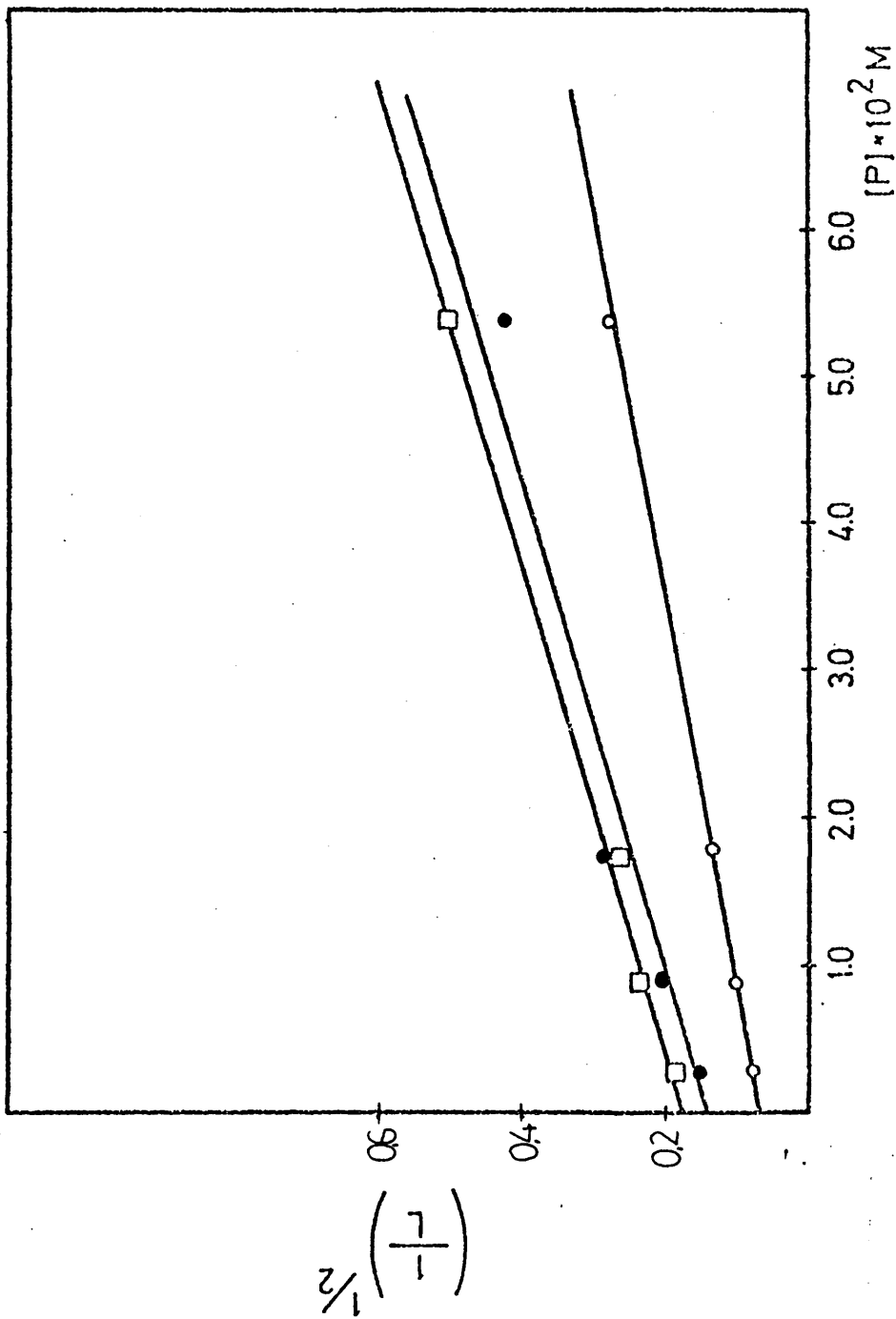


Fig. 30.- Representación de $1/L$ en función de la concentración de fosfato. \circ : 6ClPRP , \bullet : $N^6\text{MeAMP}$, \square : $N^1\text{MeAMP}$.

TABLA V

Constantes alostéricas de los complejos fosforilasa b-nucleotido, a 25°C

Nucleotido	L _O	K _p	K _A
AMP ^(a)	600	4 x 10 ⁻³	3 x 10 ⁻⁵
N ⁶ metil AMP	60	2.4 x 10 ⁻²	2.2 x 10 ⁻⁵
1-metil AMP	40	2.4 x 10 ⁻²	1.75x 10 ⁻⁴
6ClPRP	240	1.7 x 10 ⁻²	2.2 x 10 ⁻⁵

(a) Tomados de la referencia 94.

K_p y K_a : son respectivamente las constantes de disociación de los complejos fosfato-enzima y nucleótido-enzima, estando ésta en su forma R.

En las figuras 27, 28 y 29 se ha representado $(\frac{V}{V_{\max} - V})^{1/2}$ en función de la concentración de nucleótido (N_6 metilAMP, 1-NmetilAMP y 6ClPRP) a diferentes concentraciones de fosfato. Los resultados obtenidos se ajustan perfectamente a rectas, de acuerdo con lo predicho en el modelo de Monod. Las ordenadas en el origen de estas rectas son $(1/L_0)^{1/2}(1 + \frac{(P)}{K_p})$. Representando los valores de estas ordenadas en el origen en función de la concentración de fosfato se obtienen (fig. 30) L_0 y K_p , de las ordenadas en el origen y de las pendientes respectivamente. Los datos alostéricos así obtenidos se han resumido en la tabla V.

Efecto de la temperatura

Se obtuvieron las constantes de mitad de activación máxima, $K_{1/2}$, de las curvas cinéticas de cada nucleótido (incluido AMP) a 4, 10, 16, 18, 25 y 30°C. En la figura 31 se ha representado el $\log 1/K_{1/2}$ en función de $1/T$. En todos los casos se puede observar una clara discontinuidad en el intervalo de 16-18°C. Estos resultados indican que la enzima sufre un cambio conformacional entre estas temperaturas, apoyando hipótesis previas (11,100) y en perfecto acuerdo con los datos analizados en el apartado (IV-3). Es preciso hacer notar que el intervalo de tempe-

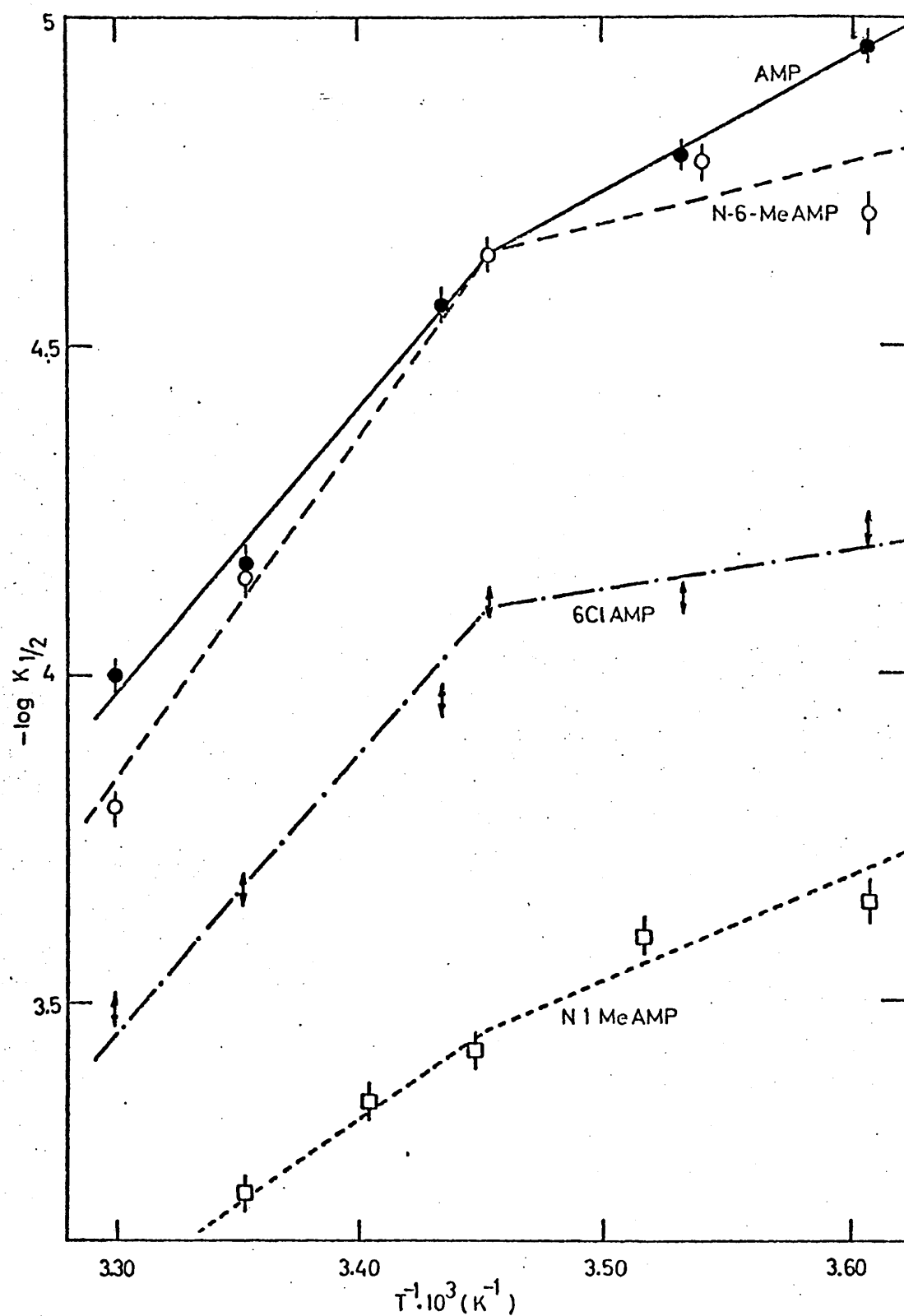


Fig.31. - Variación de la $K_{1/2}$ de activación máxima en función del inverso de la temperatura.

raturas de transición difiere ligeramente de los reportados en los artículos citados.

Valoración de "cisteínas lentas"

Los resultados obtenidos a 25°C muestran que aproximadamente dos residuos de cisteína por mol de monómero de enzima reaccionan con DTNB. Para minimizar los errores experimentales se ha trabajado a 430 nm longitud de onda próxima a la del máximo de absorción del anión TNP (412 nm).

Los dos grupos "cisteína lentos" reaccionan casi completamente, (90-95)% en aproximadamente una hora. Las fig. 32 y 33 demuestran que ambas "cisteínas lentas" son protegidas por todos los nucleótidos estudiados contra su reacción con DTNB dependiente dicha protección del tiempo de incubación de la enzima con el nucleótido. La protección es mayor cuanto mayor es el tiempo de incubación (las constantes de velocidad de valoración de los dos grupos "cisteína lentos" K_1 y K_2 se afectan), alcanzando un valor estable a partir de los 8 minutos. Por esta razón, en todos los experimentos realizados se añadió el reactivo (DTNB) después de incubar 10 minutos la enzima con el nucleótido.

El mecanismo de protección de las "cisteínas lentas" por los nucleótidos estudiados difiere de unos a otros. Así, a bajas concentraciones de nucleótido se observa (en algunos casos) una desprotección parcial de las cisteínas,

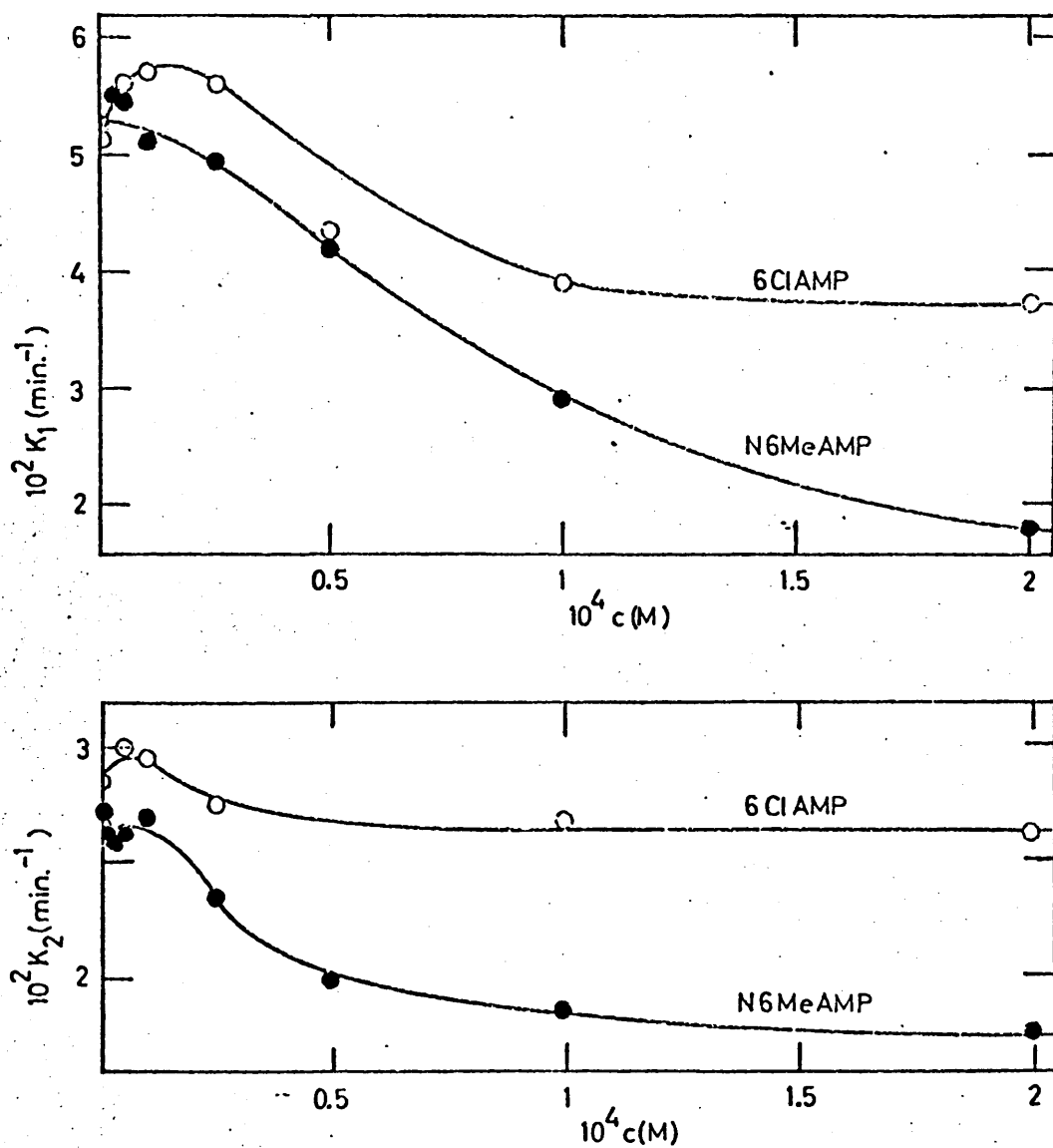


Fig.32. - Dependencia de las constantes de velocidad K_1 y K_2 de valoración de SH en función de la concentración de nucleótido.

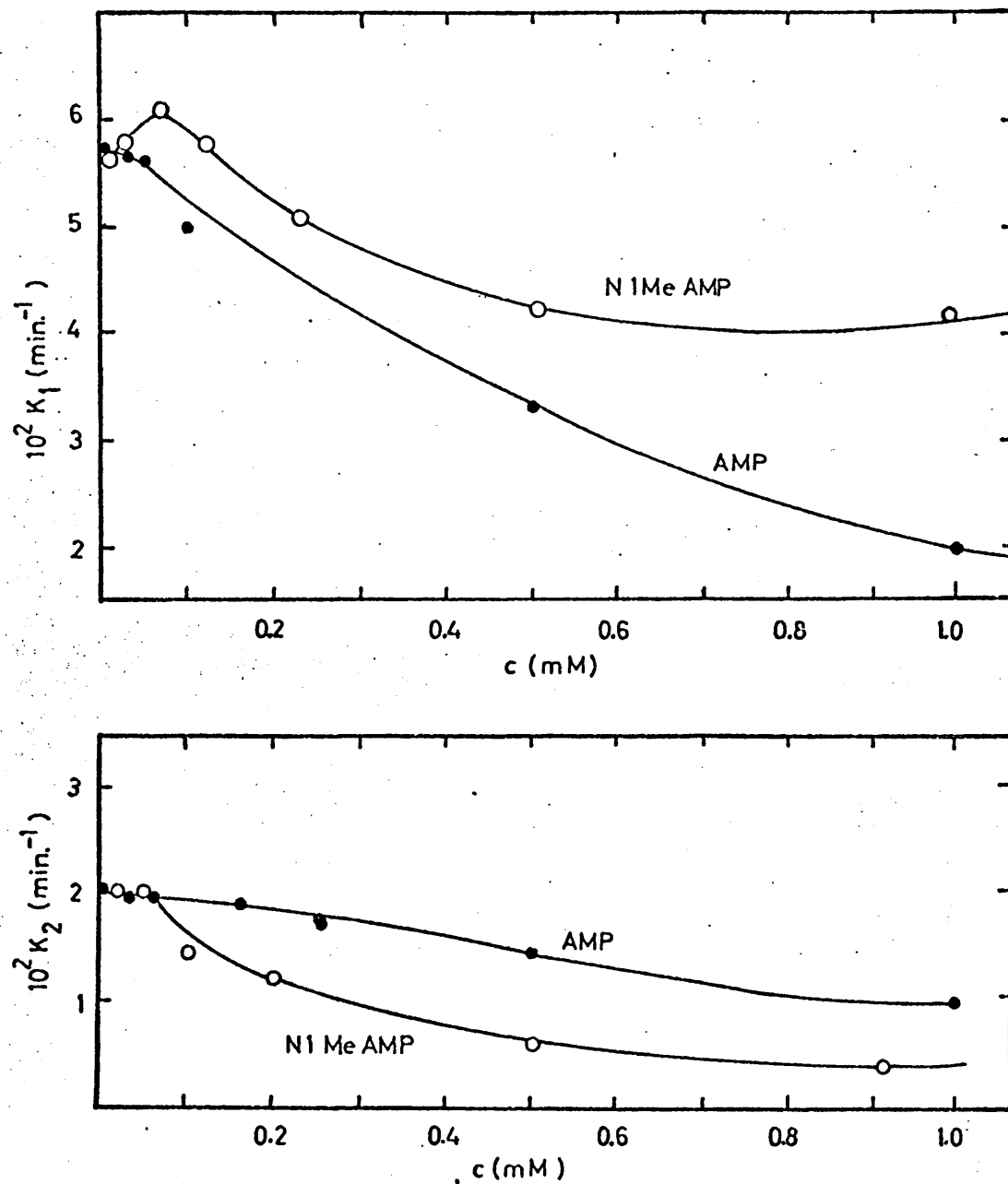


Fig. 33.- Dependencia de las constantes de velocidad K_1 y K_2 de valoración de SH en función de la concentración de nucleótido.

TABLA VI

Resultados de la valoración de la fosforilasa b por DTNB en presencia de diferentes nucleotidos, a 25°C

Nucleotido	$k_1^{1/2}$	$k_2^{1/2}$	SH_1	$SH_2^{(a)}$
AMP	$(7,4 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		10^{-4}
N ⁶ metil AMP	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$0,5 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}
1-metil AMP	$(4,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		10^{-4}
6ClPRP	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		$0,5 \times 10^{-4}$

(a) Concentración de nucleotido necesaria para el comienzo de la protección.

que se traduce en una mayor velocidad de reacción de éstas con DTNB. Para el complejo enzima 6ClPRP este efecto tiene lugar en el intervalo de concentraciones de nucleótido comprendido entre $(0.35 - 1.10) \times 10^{-4}M$ y para el complejo 1-N-metilAMP en la región : $(0.5-2.5) \times 10^{-4}M$. Además, en algunos casos, la protección sigue un comportamiento claramente sigmoideo revelando la existencia de interacciones homotrópicas (véanse las fig. 32 y 33).

En la tabla VI se dan los valores de $K_{1/2}(SH_2)$ y $K_{1/2}(SH_1)$ tomados como las concentraciones de nucleótido precisas para producir la mitad de la protección máxima alcanzable por cada nucleótido de los grupos $-SH_1$ y $-SH_2$, respectivamente. Se han estimado a partir de las figuras 32 y 33.

Discusión

La activación producida por los análogos de AMP estudiados sigue el modelo concertado, lo que concuerda con que sea la transición concertada $E_1 \rightleftharpoons E_3$ la responsable de la activación enzimática para todos ellos, de manera similar a lo que ocurre con AMP, dado que son los estados E_3 y Q los únicos que parecen ser activos, según se concluyó en el capítulo V. Sin embargo, los distintos nucleótidos estudiados conducen a diferentes estados enzimáticos finales como lo demuestran los diferentes valores de L_0 obtenidos para cada nucleótido (tabla V), aunque estas dife-

TABLA VII

Propiedades termodinámicas de los complejos fosforilasa b-nucleótido

Nucleótido	$K_{1/2}$ activ. (4°C)	$\Delta H^{(a)}$ ($T < T_t$)	$\Delta H^{(a)}$ ($T > T_t$)	$\Delta G^{(b)}$ (25°C)	$\Delta S^{(c)}$ (25°C)
AMP	$1,1 \times 10^{-5}$	- 9,3	- 20,5	- 9,8	- 36
N ⁶ metil AMP	$1,95 \times 10^{-5}$	- 4,2	- 24,2	- 10,7	- 45
1-metil AMP	$2,2 \times 10^{-4}$	- 6,8	- 11,9	- 8,1	- 13
6 Cl PRP	$6,0 \times 10^{-5}$	- 3,5	- 18,5	- 9,4	- 30

(a) T_t temperatura de transición, ΔH en Kcal/mol dímero.

(b) ΔG en Kcal/mol dímero

(c) ΔS en cal/(mol dímero) K

rencias en el estado final alcanzado tengan poca repercusión sobre el centro catalítico de la enzima ya que la activación máxima alcanzada por los diferentes nucleótidos es similar. No obstante, la afinidad de la enzima hacia el fosfato sí varía de unos estados finales inducidos a otros, siendo AMP el que conduce al estado de mayor afinidad hacia el sustrato. A partir de los datos expuestos en la tabla V puede concluirse que 1-N-metilAMP y N₆-metilAMP llevan a la enzima hacia el mismo estado final, en tanto que el estado enzimático inducido por 6ClPRP puede considerarse intermedio entre el anterior y el inducido por AMP. Los resultados de las energías de activación (tabla VII) y de protección de -SH lentos (tabla VI) confirman la inducción de diferentes estados conformacionales por los diferentes análogos.

Los resultados de la tabla IV muestran que la entrada de un grupo metilo en el N(1) de la base disminuye drásticamente la "cooperatividad aparente" del proceso de activación, aunque todos los nucleótidos estudiados (incluido 1-N-metilAMP) exhiben una alta cooperatividad homotrópica entre dos sitios de unión por dímero. Parece, pues, que el átomo de N(1) del anillo de adenina desempeña un importante papel en el proceso de activación enzimática.

Estudios conformacionales llevados a cabo con la molécula de AMP (119) concluyen que ésta puede considerarse en equilibrio termodinámico entre dos conformaciones dife-

rentes: "syn" y "anti", predominando esta última (66%). Por estudios de RSE y RMN (120) se ha demostrado que la interacción entre AMP y el complejo enzima-Mg⁺⁺ conduce al complejo ternario: AMP-(Mg⁺⁺ enzima), en el que el nucleótido se halla fuertemente inmovilizado, adoptando una conformación rígida.

A continuación analizaremos si los resultados mecanocuánticos obtenidos por Pullman y Pullman (121), que indican la quelación de la adenina (base del nucleótido) con Mg⁺⁺ via el NC7) del anillo y el N del grupo amino, son válidos para la quelación que ha de tener lugar en el seno de la fosforilasa b entre AMP y Mg⁺⁺.

Okazaki y col. (113) comunicaron que con el derivado de AMP : 9-p-D-ribofuranosil-6-cloro-3-deazapurina-5' fosfato, la activación máxima enzimática alcanza sólo un 26% de la activación máxima inducida por AMP y su K_{1/2} de activación es 120 veces mayor que la de AMP. Estos investigadores atribuyeron tan drásticos efectos a la sustitución del grupo amino en C(6) por un átomo de cloro. El resultado obtenido con 6ClPRP demuestra que esa hipótesis ha de ser necesariamente errónea (véase la tabla IV). La única explicación que resta consiste en atribuir las a la eliminación del átomo N(3) del anillo de adenina. Ahora bien, los estudios conformacionales realizados en la molécula de AMP muestran la importancia del N(3) del anillo de adenina y del -OH (en 2') de la ribosa para la es-

tabilización de la conformación "syn" del nucleótido (119). Por tanto, dada la gran importancia que ambos grupos citados poseen en la unión de AMP a la enzima, es lógico concluir que AMP adopta en el complejo que forma con la fosforilasa b su conformación "syn". Esta hipótesis se ve apoyada por la baja activación y mala fijación de α -AMP y con que 3-isoAMP posea la misma afinidad que AMP hacia la enzima y active un 40% más que éste, ya que en este nucleótido la repulsión entre la base y el fosfato (que inestabiliza parcialmente la conformación syn) se ve disminuída.

Por otra parte, si las hipótesis de Pullman y Pullman (121) se verificaran en la fosforilasa b, el grupo amino en el C(6) de la adenina no habría de ser imprescindible pues la quelación de la base con Mg^{++} por dicha posición sólo exige en ella un grupo con pares electrónicos sin compartir, con capacidad donadora de electrones.

En las tablas IV y V puede observarse que N_6 -metilAMP y 6ClPRP son casi tan buenos activadores como el propio AMP, siendo además las constantes de disociación de sus respectivos complejos nucleótido-enzima casi idénticas a la del complejo AMP-enzima. Estos hechos confirman la hipótesis anterior, pudiendo atribuirse las pequeñas diferencias en las constantes de disociación a las diferentes capacidades donadoras de electrones de los grupos

sustituyentes en el C(6) del anillo de adenina. El resultado obtenido por Okazaki y col. (113) con N_6N_6 -dimetil-AMP apoya también la hipótesis anterior, pues muestra una constante de mitad de activación sólo ligeramente superior, hecho que puede atribuirse al volumen de los grupos metilo.

Por otra parte, de acuerdo también con las hipótesis de Pullman (121) los nucleótidos 7-deaza-AMP y 9- β -D-ribofuranosilpurina-5'-fosfato poseen una débil afinidad hacia la enzima, pero alcanzan el mismo nivel de activación de AMP (113). Esto puede interpretarse fácilmente si consideramos que el efecto del Mg^{++} consiste simplemente en una elevación de la afinidad de la enzima hacia AMP, sin afectar el nivel de máxima activación alcanzada y que en estos derivados se han eliminado puntos de quelación del Mg^{++} con AMP.

La modificación covalente en el N(1) del anillo de adenina reduce la afinidad de la enzima hacia el nucleótido, así la constante de disociación del 1-N-metilAMP es diez veces superior a la de AMP, al tiempo que la cooperatividad del proceso de activación disminuye. Estos resultados pueden ser interpretados de dos maneras diferentes: a) la enzima se une directamente al átomo de N(1) de la adenina; (b) la interacción de la enzima con la adenina de la molécula de AMP viene determinada principalmente por la distribución electrónica de la nube del anillo de adenina. Si la hipótesis (b) fuera cierta

la afinidad de la enzima hacia N_6 metilAMP y N_6N_6 dimetilAMP debería ser mayor que la afinidad de la misma hacia AMP. Los resultados dados en la tabla IV muestran que esto no es cierto, lo cual invalida esta hipótesis.

Los nucleótidos estudiados presentan una mayor afinidad hacia la enzima a temperaturas inferiores a $(16-18)^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que la enzima sufre un cambio conformacional. Como se deduce directamente de los valores de $K_{1/2}$ (activación) a 4°C para los diferentes nucleótidos estudiados, el estado conformacional enzimático estabilizado a temperaturas inferiores a la temperatura de transición presenta una mayor sensibilidad hacia pequeñas modificaciones en la base de la molécula de AMP que el predominante a temperaturas superiores a dicha temperatura de transición. En el intervalo de 4 a 30°C la cooperatividad del proceso de activación permanece constante para cada nucleótido. Como el valor de $K_{1/2}$ es proporcional a la constante de disociación y a la cooperatividad del proceso pueden obtenerse las entalpías de los complejos nucleótido-enzima a partir de las pendientes de las rectas de la fig.30. Los valores obtenidos se dan en la tabla VII.

La constancia del intervalo de temperatura en el que tiene lugar la transición conformacional difiere de los resultados reportados en la bibliografía (11) que

muestran como este intervalo varía o bien cuando la enzima se modifica en la zona de unión del piridoxal-5'-fosfato o por la acción de AMP sobre la enzima. Como los diferentes nucleótidos estudiados producen distintos cambios conformacionales en la enzima, la constancia en el intervalo de temperaturas de transición demuestra que dicho intervalo es sólo afectado por modificaciones en la enzima que afecten a la región enzimática implicada en la unión del piridoxal-5'-fosfato. Por otra parte, los valores de entalpía ΔH dados por Kastenschmidt y col. (11) difieren de los de formación del complejo AMP-fosforilasa b , a temperaturas inferiores a la temperatura de transición, siendo la misma a temperaturas superiores a ésta. Esto indica que a temperaturas superiores a $(18-20)^{\circ}\text{C}$ la contribución más importante a la entalpía ΔH proviene de la formación del complejo AMP-fosforilasa b .

Puesto que el proceso de ruptura del glucógeno se utiliza como fuente de energía por el organismo (120) los resultados mostrados en la tabla VII muestran que dicho proceso se ve favorecido a temperaturas superiores a 20°C .

Los cambios entrópicos asociados a la formación del complejo nucleótido-fosforilasa b (tabla VII), a 25°C fueron calculados utilizando la constante de equilibrio global, K_t , del proceso. (Recordando que la activación

por los nucleótidos estudiados sigue el modelo de Monod con unión exclusiva de AMP al estado R : $K_t = L_p \cdot K_a$, donde L_p es la constante de equilibrio transconformacional a una concentración dada de fosfato y K_a es la constante de disociación del complejo nucleótido-enzima (forma R) :



despreciando la unión de la segunda molécula de nucleótido, que no ha de producir alteraciones entrópicas apreciables.

Los valores obtenidos para ΔS demuestran que los nucleótidos estudiados en este apartado producen grandes cambios conformacionales en la enzima. Corroboran, asimismo, la conclusión - obtenida a partir de los valores de L_0 - de que 1-N-metilAMP y N_6 -metilAMP inducen estados enzimáticos muy similares.

El 6ClPRP, que posee el sustituyente más pequeño en C(6) del anillo de adenina, es el que provoca el menor cambio entrópico.

Además de estas diferencias pueden señalarse las siguientes, en el comportamiento de los complejos análogos de AMP (estudiados) - fosforilasa b :

i) La función de saturación, \bar{Y} , que puede obtenerse fácilmente a partir de los parámetros alostéricos dados en la tabla V (12) es diferente para los distintos nucleótidos a la concentración de nucleótido precisa para producir la mitad de la activación máxima propia de cada nucleótido. El valor de $K_{1/2}$ habría de ser igual a 0,5 si AMP participara directamente en la inducción de la actividad catalítica de cada subunidad. Sin embargo, los valores calculados de $K_{1/2}$ son: $K_{1/2}$ (AMP) = 0,125; $K_{1/2}$ (N_6 metilAMP) = 0,27; $K_{1/2}$ (1-N-metilAMP) = 0.39 y $K_{1/2}$ (6ClPRP) = 0.185.

ii) El orden cualitativo de L_p de los cuatro nucleótidos - obtenido a partir de L_o y K_p - varía con la concentración de fosfato.

Por consiguiente, pequeños cambios en la base de la molécula de AMP afectan al mecanismo catalítico de una manera compleja. Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que AMP sólo desempeña un papel indirecto y regulador en el proceso catalítico (5).

Los resultados de valoración de las dos "cistefinas lentas" por DTNB permiten concluir que los nucleótidos estudiados (incluido AMP) protegen a éstas de un modo indirecto, ya que la protección no es completa y las constantes de semiprotección de los -SH lentos (tabla VI) no coinciden con las constantes de disociación de los complejos nucleótido-enzima ni con los valores de $K_{1/2}$ activación. El

1-N-metilAMP es el nucleótido que difiere más en su comportamiento respecto de los demás, ya que protege muy débilmente los dos residuos de "cisteínas lentas" (las K_1 y K_2 sólo disminuyen hasta un 75% de su valor en la enzima sola), lo que parece confirmar la hipótesis de que en este nucleótido ha desaparecido un punto de unión directo con la enzima (N (1)) que ha de alterar, consecuentemente, la posición de la base de la molécula de AMP en su sitio de unión, afectando además la interacción de la misma con un grupo aromático de la enzima: [122).

La sustitución en el C(6) del grupo amino por un átomo de cloro no altera significativamente el nivel de máxima activación alcanzado por la enzima, aunque sí afecta fuertemente el mecanismo y balance energético del proceso de activación. Concordantemente, los resultados de la valoración de "-SH lentos" muestran características diferentes al comparar los resultados obtenidos con los diferentes análogos de AMP.

Estas diferencias pueden resumirse como una pérdida en la capacidad de discriminación entre ambas cisteínas lentas en el caso de la acción de 6ClPRP respecto a la de AMP; gran similitud de las constantes de velocidad K_1 y K_2 en valor absoluto y en función de la concentración de nucleótido. En otras palabras: la base del nucleótido adopta una posición relativa respecto de las dos cisteínas forzosamente diferente a la adoptada

por la adenina (base de AMP) ya que compiten por los mismos sitios de unión. En todos los casos, excepto para N_6 -metilAMP ambas "cisteínas lentas" comienzan a ser protegidas a la misma concentración de nucleótido (que difiere de unos a otros) - véase la tabla VI. Para N_6 -metilAMP el grupo amino sustituido ha de conducir a un diferente posicionamiento de la base púrica respecto de los dos grupos -SH, lo que puede explicarse si se considera la protección selectiva de un grupo -SH lento en la unión directa del nucleótido, y el otro en el cambio conformacional inducido por el activador. Puesto que el proceso de unión de este nucleótido a la enzima parece seguir el "modelo concertado" lógicamente el porcentaje de protección del -SH lento protegido por el cambio conformacional ha de ser mayor a menor concentración de nucleótido ($-SH_1$) que el porcentaje de protección del -SH lento protegido en la unión del nucleótido a sus sitios específicos en la enzima ($-SH_2$). Por tanto, el grupo $-SH_2$ ha de hallarse más próximo al sitio de unión de AMP que el grupo $-SH_1$.

Si se comparan los datos de la tabla V con los obtenidos en la valoración de las "cisteínas lentas" por DTNB resulta claro que pequeñas alteraciones en la posición de la base púrica del nucleótido (por consiguiente, de éste en el sitio de unión) modifican la afinidad de la enzima hacia el fosfato, lo que puede entenderse si los sitios de unión de AMP y del fosfato se hallan próximos en

la enzima, confirmando los datos obtenidos con otras técnicas (6, 49, 122).

II. Resultados microcalorimétricos

La figura 34 muestra que los análogos de AMP estudiados (6ClPRP, N₆-metilAMP, 1-N-metilAMP e IMP) desplazan al AMP-C¹⁴, a 25°C. Todas las curvas de desplazamiento de AMP-C¹⁴ por los nucleótidos citados pueden superponerse dentro de los errores experimentales corrigiendo la concentración de los mismos por un factor constante, $\{a$, propio de cada uno de ellos (véase la tabla VIII). Los valores de $\{a$, se han obtenido a partir de la relación $K_{1/2(\text{caza})}(\text{AMP})/K_{1/2 \text{ caza}}(\text{NMP})$, donde $K_{1/2 \text{ caza}}$ es la concentración de nucleótido (NMP) precisa para producir un desplazamiento del 50% del compuesto radiactivo unido a la enzima. Lógicamente este factor, $\{a$, ha de estar relacionado con la afinidad relativa de la enzima hacia los distintos nucleótidos respecto de AMP. Puede observarse que, en perfecto acuerdo con los datos cinéticos obtenidos, N₆-metil AMP presenta la misma afinidad que AMP hacia la enzima, siendo menor la del 1-N-metil AMP.

En las figuras 35, 36, 37 y 38 se dan los resultados obtenidos en la valoración entálpica a 25°C de la fosforilasa \underline{b} (2,67 mg/ml) por N₆-MetilAMP, 1-N-metil-AMP, 6ClPRP e IMP, respectivamente. Pueden observarse las siguientes analogías y diferencias:

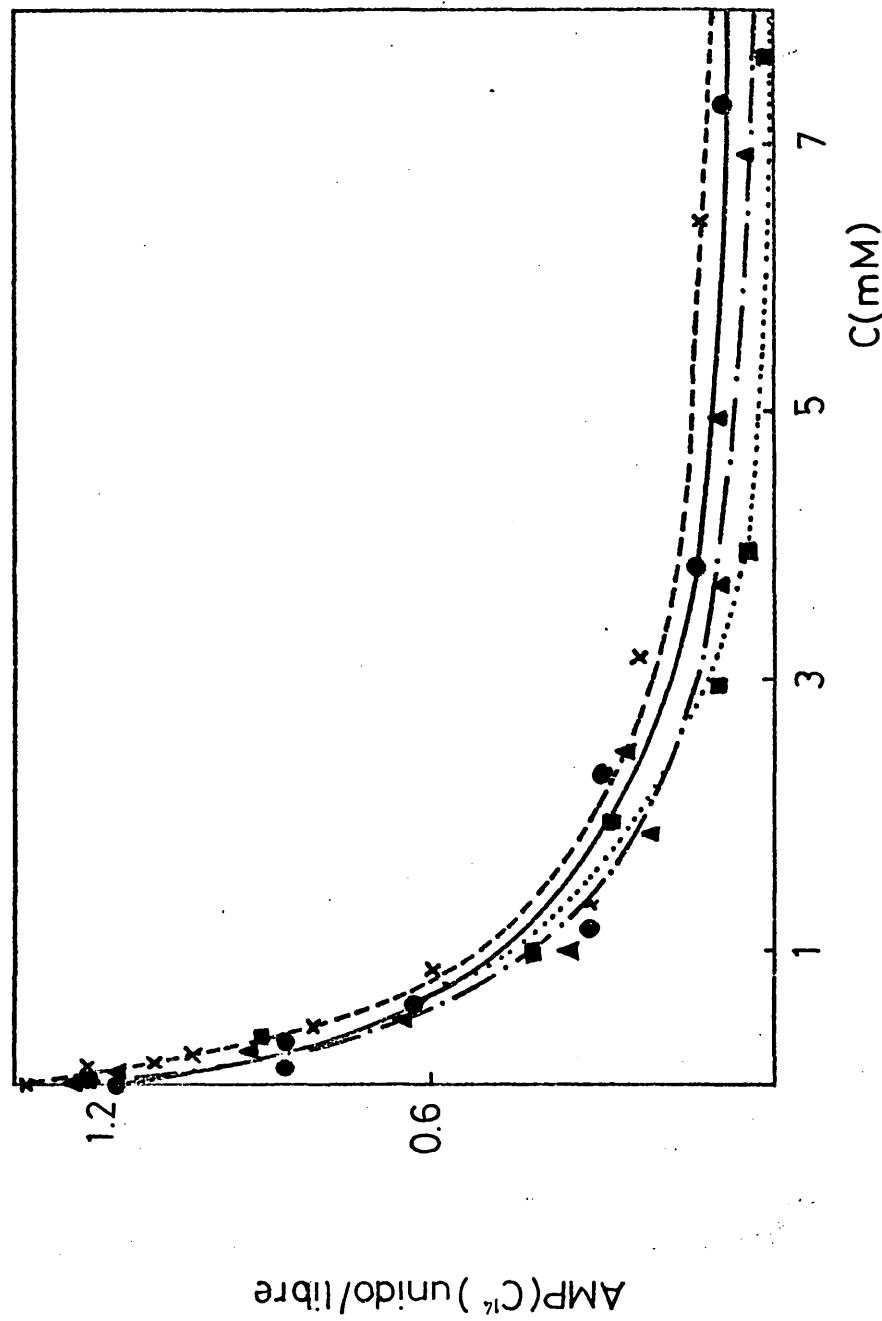


Fig. 34.- Desplazamiento del AMPC^{14} unido a la enzima por diversas concentraciones de nucleotido.
 \bullet : N^1MeAMP , \blacktriangle : N^6MeAMP , \times : 6ClAMP , \blacksquare : IMP .

TABLA VIII

Desplazamiento de AMP-C¹⁴ por distintos nucleótidos, a 25° C

Nucleótido	K _{1/2} caza	f _a
AMP	1, 2 x 10 ⁻⁴	1, 00
N ⁶ metil AMP	1, 2 x 10 ⁻⁴	1, 00
1 - metil AMP	4, 2 x 10 ⁻⁴	0, 29
6 - CIPRP	3, 3 x 10 ⁻⁴	0, 36
IMP	2, 0 x 10 ⁻⁴	0, 60

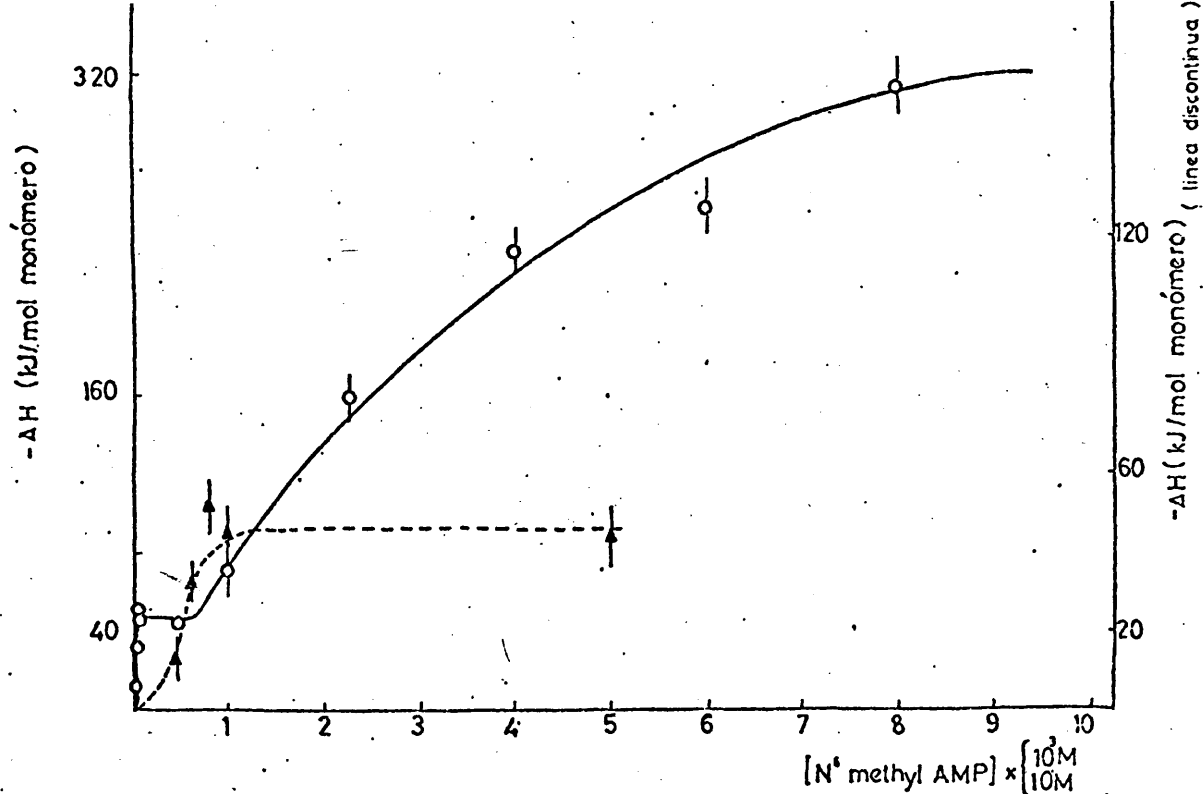


Fig.35 Entalpia de interacción de la fosforilasa b con N^6 MeAMP a 25°C .
[Fosforilasa] = 2,66 mg/ml.

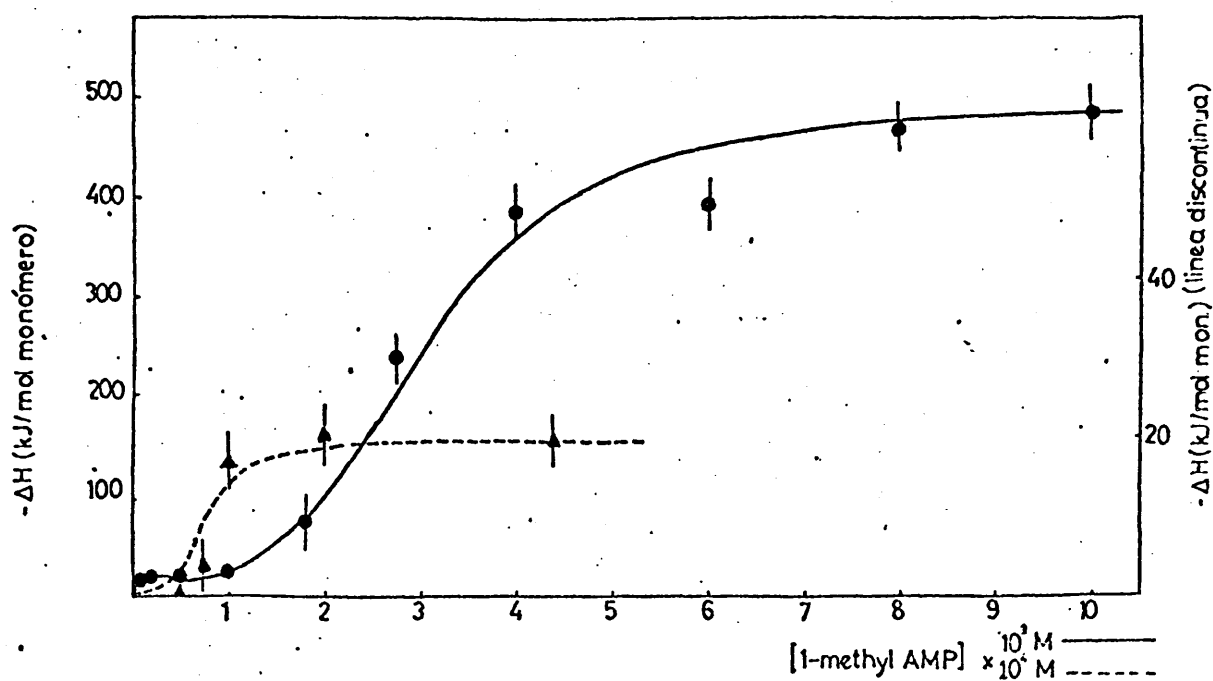


Fig.36. - Entalpia de interacción de la fosforilasa b con N^1 MeAMP a 25°C . [Fosforilasa] = 2,66 mg/ml.

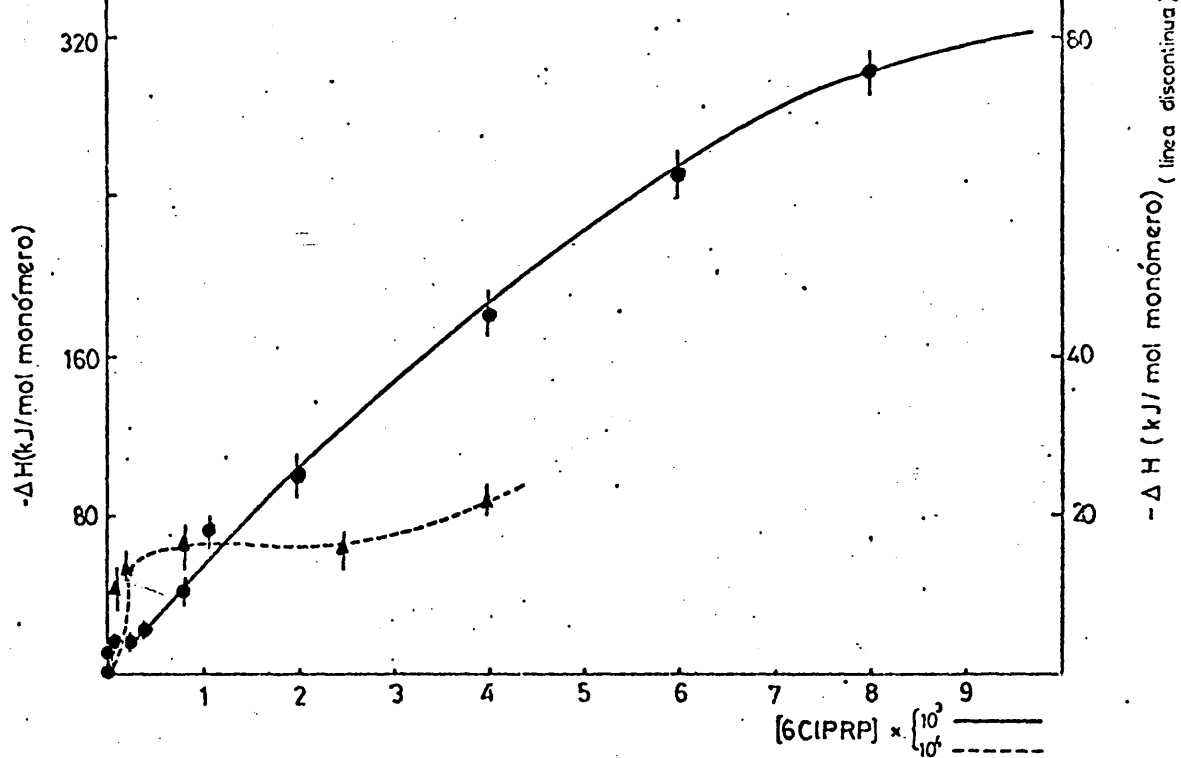


Fig. 37. -Entalpia de interacción de la fosforilasa b con 6ClPRP a 25°C. [Fosforilasa] = 2,66 mg/ml.

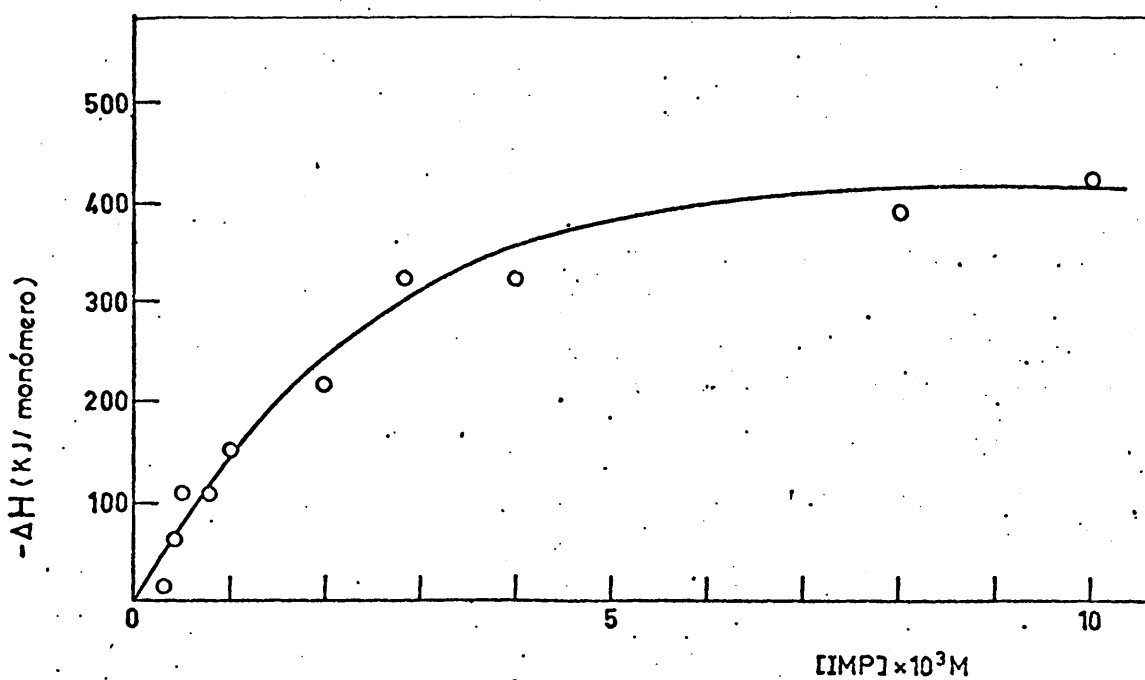


Fig. 38. - Entalpia de interacción de la fosforilasa b con IMP a 25°C. [Fosforilasa] = 2,66 mg/ml.

- a) Excepto IMP los demás análogos presentan dos mesetas claramente definidas que revelan al igual que AMP, la existencia de dos clases de sitios de unión de diferente afinidad hacia los nucleótidos. Siguiendo la clasificación dada por Buc y col. (69) estos análogos de AMP, excepto IMP, pueden ser considerados de la clase de AMP.
- b) En todos los casos estudiados, excepto para IMP, el carácter sigmoideo en la región de saturación de la primera clase de sitios es evidente, observándose la existencia de una fuerte cooperatividad homotrópica.
- c) La cooperatividad de la segunda región de las curvas se ve fuertemente afectada por sustituciones químicas en la molécula de AMP. Así, N_6 -metilAMP y 6ClPRP no exhiben cooperatividad en el proceso de saturación del tipo de sitios de menor afinidad.
- d) La valoración entálpica de la fosforilasa b por IMP da una curva hiperbólica que revela una total ausencia de cooperatividad en el proceso de interacción de IMP con la fosforilasa b .
- e) Las entalpías de las primeras mesetas de las curvas de valoración entálpica de la enzima por 1-N-metilAMP, N_6 -metil-AMP y 6ClPRP son diferentes entre sí y distintas a las de la curva de AMP, lo que revela una diferente interacción en los casos citados que conduce a estados finales distintos, puesto que, según se concluyó en el estudio

realizado con AMP, la aportación entálpica más importante a la entalpía total medida, proviene del cambio conformacional producido por el nucleótido en la enzima, conclusión que se ve confirmada por los resultados cinéticos.

Los elevados cambios entálpicos medidos inducen a considerar la posibilidad de tetramerización de la fosforilasa b en estos casos, por similitud a lo que ocurría con AMP. Los resultados de ultracentrifugación realizados a 25°C demuestran que N₆-metil-AMP, 1-N-metilAMP y 6ClPRP tetramerizan completamente a la fosforilasa b (2,67 mg/ml) a concentraciones de nucleótido de saturación de la segunda meseta de la curva calorimétrica, ya que la enzima migra en estas condiciones en un solo pico simétrico de (12.8-13.2)S. En las condiciones anteriores, pero a concentraciones de los nucleótidos de saturación de la primera meseta, la enzima migra, en su mayor parte, con un coeficiente de sedimentación igual a 8.6S (dímero), apareciendo también un pico muy pequeño (< 5% del total de enzima) que corresponde al tetrámero de la fosforilasa b. Sin embargo, IMP a concentraciones de saturación (10⁻²M) es incapaz de tetramerizar a la enzima (2,67 mg/ml) que migra, con un coeficiente de sedimentación de 8.6S (dímero).

El análisis cuantitativo de las curvas de valoración entálpica de la fosforilasa b por N₆metil-AMP,

1-N-metil-AMP, 6ClPRP e IMP revela que todos estos nucleótidos presentan diferencias apreciables con respecto a AMP en su acción sobre la fosforilasa b.

La primera región de la curva de la fig. 36, correspondiente a 1-N-metilAMP puede ser tratada siguiendo el método y esquema cinético utilizado para el análisis de la primera región de la curva de AMP (véase el apartado IV-4). Como se demostró allí, para sistemas alostéricos que siguen el modelo concertado con unión exclusiva del ligando a un estado (estado R_1) y fuerte interacción homotrópica entre dos sitios. En la tabla IX se dan los valores $^{(1)}L_0$ y $^{(1)}k_R$ que permiten un buen ajuste de la curva teórica a los datos experimentales obtenidos para la primera región de la curva de la fig. 36.

La primera región de las curvas de valoración entálpica de la fosforilasa b por N_6 -metilAMP y 6ClPRP pueden ser descritas también siguiendo el tratamiento utilizado para AMP y 1-N-metilAMP. No obstante, los valores de las constantes de disociación $^{(1)}k_R$ que se obtienen son anormalmente bajos ($\leq 10^{-6}M$) y los valores de $^{(1)}L_0$, excesivamente elevados al ser comparados con los obtenidos por métodos cinéticos. El proceso de saturación entálpico de la primera clase de sitios de unión por N_6 metilAMP y 6ClPRP puede también describirse mediante un tratamiento alostérico que postule una alta cooperatividad "aparente" entre cuatro centros independientes de unión. La entalpía en el pro

ceso de saturación se rige entonces por la ecuación:

$$\frac{{}^{(1)}\Delta H_T}{{}^{(1)}\Delta H_p} = \frac{\alpha^4 (1 + \alpha)^2}{{}^{(1)}L_0 + (1 + \alpha)^2 (1 + \alpha^4)} \quad (VI-1)$$

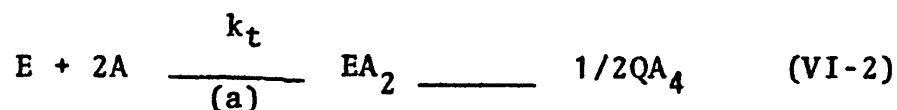
donde todos los símbolos utilizados poseen el significado previamente dicho. Se ha considerado que

$${}^{(1)}L = {}^{(1)}L_0 / (1 + \alpha)^2$$

entendiendo que la enzima presenta dos centros de unión por dímero capaces de interaccionar fuertemente con los de otro dímero, exigiendo el proceso de cambio transconformacional la unión de una molécula de nucleótido por dímero. Los valores obtenidos para ${}^{(1)}k_R$ y ${}^{(1)}L_0$, siguen un ajuste paramétrico de ${}^{(1)}k_R$ y ${}^{(1)}L_0$ para adecuar la expresión (VI-2) a los resultados experimentales, se dan en la tabla IX.

El análisis cuantitativo de la segunda región de la curva de 1-N-metilAMP mostrada en la fig. 36 se ha realizado de la misma forma que la segunda región de la curva de valoración de la fosforilasa con AMP, los resultados obtenidos se dan en la tabla IX.

El tratamiento teórico de las regiones hiperbólicas de las curvas de 6ClPRP y N6metilAMP se ha hecho considerando el siguiente esquema cinético de saturación, basado en la existencia de dos sitios de unión por dímero (unidad funcional):



donde $:(E)$, es el estado dimérico de la fosforilasa b al que se llega después de saturar la primera clase de sitios de unión. (A) , es el nucleótido y QA_4 es el tetrámero de fosforilasa b saturado por el nucleótido.

El tetrámero se forma, pues, una vez saturados los sitios de débil afinidad hacia el nucleótido en el dímero, en completo paralelismo con el AMP. Otra posibilidad cinética no permite un ajuste de los datos experimentales.

De manera similar a la seguida por Wadso y col. (123) para la interacción lisozima-N-acetilglucosamina, se deduce la ecuación siguiente, considerando que la entalpía de unión del nucleótido a la enzima puede despreciarse frente a la entalpía de asociación de esta:

$$\Delta Q = \frac{1/2 \Delta Q_{\max} [A]^2}{k_T + [A]^2} \quad (VI-3)$$

donde: ΔQ es el calor medido a una concentración (A) de nucleótido; ΔQ_{\max} , es el calor de saturación de la curva de valoración; k_T , es la constante de disociación global del complejo EA_2 relacionada con la constante intrínseca de disociación k_d , por la relación: $k_T = k_d^2$, (107)

A partir de las representaciones gráficas de $1/\Delta Q$ frente a $1/(A)^2$ (fig. 39) de las segundas regiones de las curvas dadas en las figuras 35 y 37, se han obtenido ΔH_{\max} y K_T de la ordenada en el origen y de la pendiente, de acuerdo con la ecuación

TABLA IX

Resultados calorimétricos y constantes alostéricas de los nucleótidos estudiados, a 25° C

Nucleótido	$-\frac{\Delta H_1}{\text{kJ/mol monómero}}$	$-\frac{\Delta H_T}{\text{kJ/mol monómero}}$	(1) _{L_O}	(1) _{k_R}	(2) _{L_O}	(2) _{k_R}
AMP	77 ± 2	361 ± 20	700	1,0 x 10 ⁻⁵	60.000	1,9 x 10 ⁻⁴
1-metil AMP	21 ± 2	480 ± 25	6.000	9,8 x 10 ⁻⁷	100.000	1 x 10 ⁻⁴
N ⁶ metil AMP	45 ± 2	550 ± 50	600	2,2 x 10 ⁻⁵	--	--
6 Cl PRP	17 ± 2	550 ± 50	450	7,5 x 10 ⁻⁶	--	--
IMP	--	425 ± 15	--	--	--	2,8 x 10 ⁻⁴

TABLA X

Datos termodinámicos de la formación de complejos nucleótidos-fosforilasa b, a 25° C

Nucleótido	$\frac{-\Delta G_I}{\text{kJ/mol dímero}}$	$\frac{\Delta S_I}{\text{cal/(mol dímero)K}}$	$\frac{-\Delta G_{II}}{\text{kJ/mol dímero}}$	$\frac{\Delta S_{II}}{\text{cal/(mol dímero)K}}$
AMP	40 ± 4	- 91 ± 10	15 ± 1	- 444 ± 40
N ⁶ metil AMP	37 ± 2	- 42 ± 8	31 ± 4	- 740 ± 50
1-metil AMP	47 ± 2	- 22 ± 2	17 ± 2	- 354 ± 30
6 Cl PRP	43 ± 3	7 ± 1	31 ± 4	- 740 ± 50
IMP	29 ± 2	- 313 ± 13	--	--

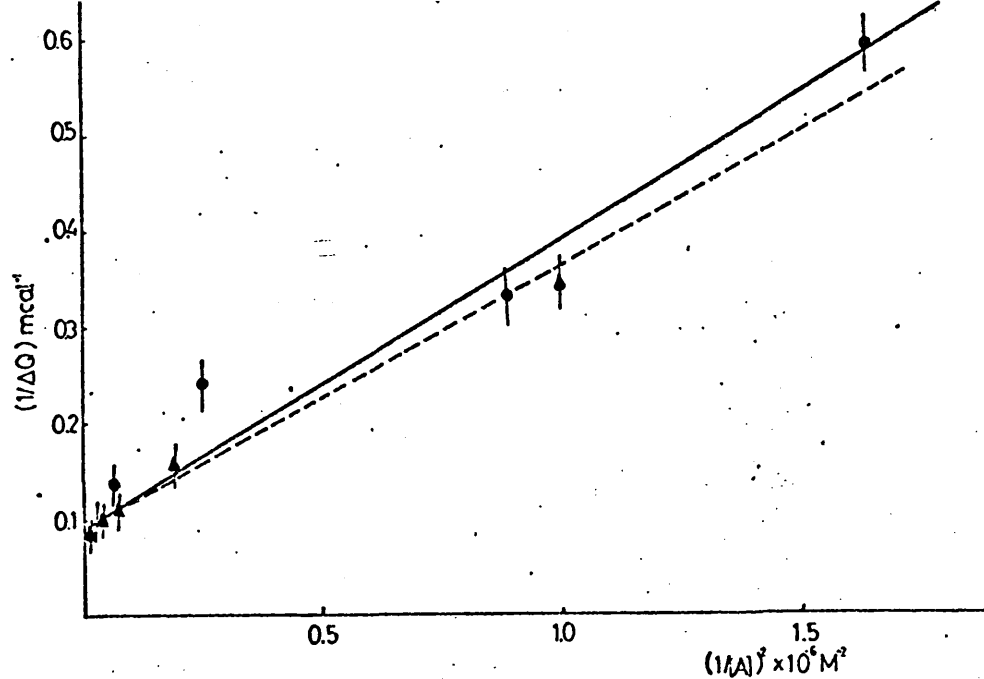


Fig. 39. - Representación de inversos de los resultados calorimétricos de la segunda región de las curvas de las figuras 35 y 37.

● 6ClPRP, △ N⁶MeAMP.

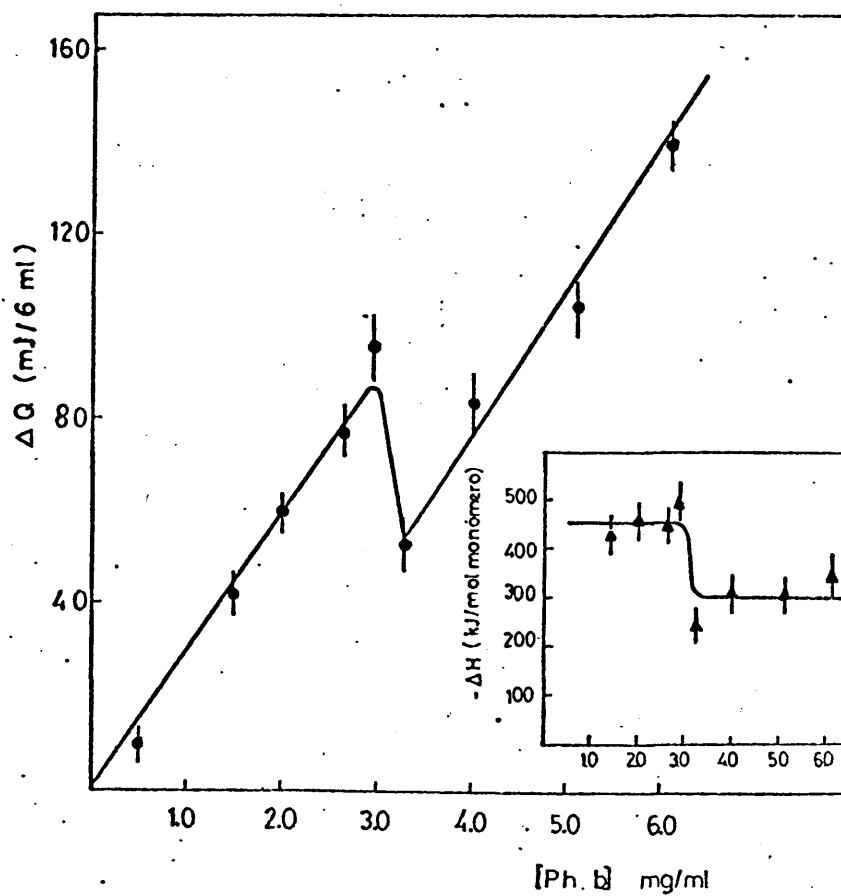


Fig. 40. - Valoración calorimétrica de la interacción fosforilasa b-N⁶MeAMP, en función de la concentración de enzima. Recuadro: Entalpía de interacción de los resultados anteriores.

$$\frac{1}{\Delta Q} = \frac{2}{\Delta Q_{\max}} + \frac{2 k_t}{\Delta Q_{\max}} \cdot \frac{1}{(A)^2} \quad (\text{VI-4})$$

Los valores de k_t y ΔH_{\max} se dan en la tabla IX.

La ecuación que rige la saturación entálpica de IMP es la utilizada previamente por Wadso y col. (123) para el sistema citado anteriormente. Una representación de inversos permite obtener los valores de K_d y ΔH_{\max} , dados en la tabla IX, a partir de la pendiente y ordenada en el origen. La expresión dada por Wadso y col. para este tipo de sistemas es:

$$\Delta Q = \frac{\Delta Q_{\max} \cdot (A)}{K_T + (A)} \quad (\text{VI-5})$$

En la tabla X se han resumido los datos termodinámicos, ΔG° y ΔS° , asociados a la interacción de los distintos nucleótidos con los sitios de mayor y menor afinidad enzimáticos (para IMP los de su unión a la única clase de sitios que reconoce en la enzima). El proceso es, en todos los casos, claramente espontáneo y exotérmico. De entre todos ellos es AMP el que produce un mayor cambio entrópico al unirse a los sitios de mayor afinidad, y el menor ΔS° al unirse a los sitios de menor afinidad.

Transición conformacional enzimática dependiente de la concentración de fosforilasa b.

Se ha realizado un estudio de las interacciones

entre la enzima y 1-N-metil-AMP, N₆metil AMP e IMP en función de la concentración de enzima, para comprobar si estos nucleótidos se comportaban de manera similar al AMP.

En las figuras 40, 41 y 42 se han representado los resultados obtenidos. Puede observarse que existe un ligero desplazamiento en el intervalo de transición detectado por 1-N-metilAMP. Sin embargo, el caso más interesante es el de IMP. Su comportamiento difiere de todos los demás analizados hasta ahora (véase el capítulo V y las fig. 40 y 41). Como puede observarse en la fig. 42 al disminuir la concentración de enzima se produce un brusco aumento en la entalpía de interacción IMP-fosforilasa b que puede explicarse suponiendo una interacción inespecífica a muy elevada relación de moléculas de IMP/moléculas de enzima, ya que no se detecta la presencia de agregados (distintos de dímero) de fosforilasa b en presencia de IMP.

Por esta razón, se ha realizado un estudio de la variación de la entalpía de interacción IMP-fosforilasa b a concentración de enzima de 1,0 mg/ml. En la fig. 43 se dan los resultados obtenidos, junto con los de 2,67 mg/ml de enzima, representados en función de la relación de moléculas de IMP a moléculas de enzima. Puede apreciarse que la saturación entálpica tiene lugar en el mismo intervalo; es decir, que al igual que ocurría

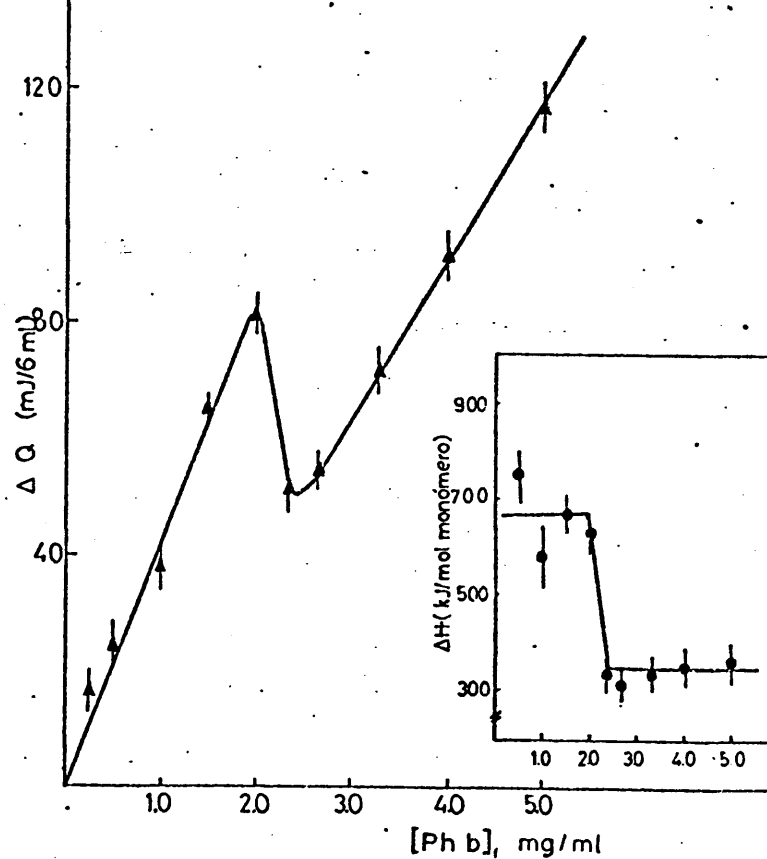


Fig.41. - Valoración calorimétrica de la interacción fosforilasa b-N⁶MeAMP, en función de la concentración de enzima. Recuadro: Entalpia de interacción de los resultados anteriores.

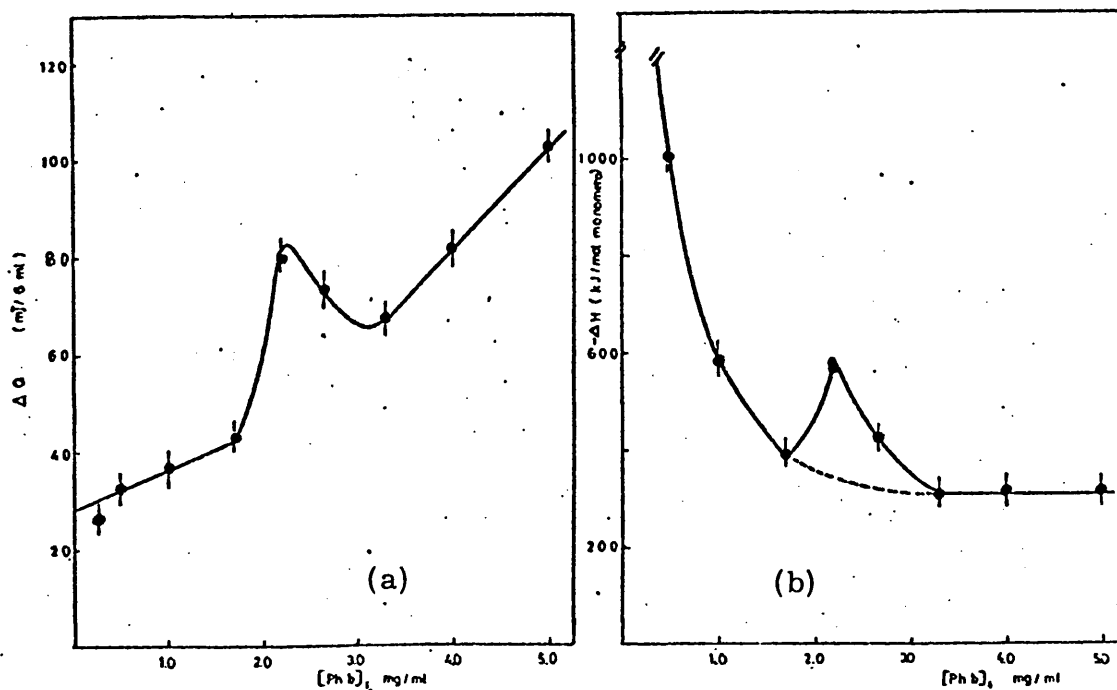


Fig.42. - a) Valoración calorimétrica de la interacción fosforilasa b-IMP en función de la concentración de enzima. b) Entalpia de interacción fosforilasa-IMP.

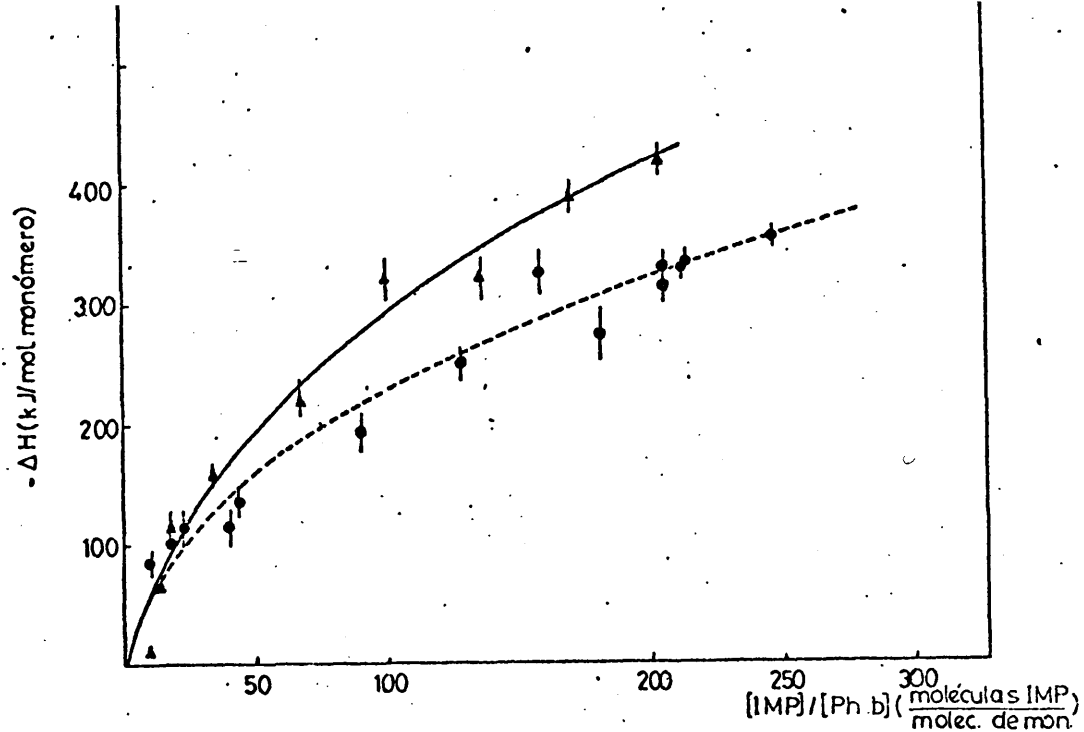


fig.43. - Valoración entálpica de la fosforilasa b por IMP, en función de la relación $[IMP]/[Ph\ b]$
 ——— $[Ph\ b] = 2,66 \text{ mg/ml}$. ----- $[Ph\ b] = 1 \text{ mg/ml}$.

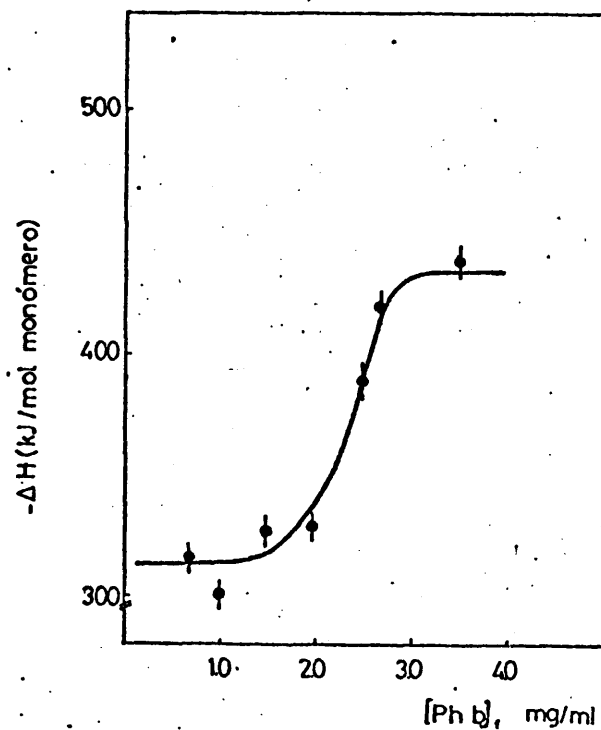


Fig.44.- Entalpia de interacción de la fosforilasa b por IMP, en función de la concentración de enzima. En los experimentos se ha mantenido constante la relación $[IMP]/[Ph\ b]$.

con AMP, es la relación de moléculas de nucleótido/moléculas de enzima la que determina el grado de saturación entálpica. Manteniendo constante la relación moléculas-de IMP/moléculas enzima se ha estudiado como se ve afectada la entalpía de interacción IMP-enzima por la concentración de esta. Los resultados experimentales se dan en la figura 44 y confirman la hipótesis utilizada para explicar los resultados de la fig. 42, es decir, la existencia de interacciones no específicas de IMP con la enzima a muy elevado valor de la relación moléculas IMP/moléculas enzima. Una vez controlada esta variable, la transición adquiere las mismas características que la observada para AMP, excepto que en este caso, la unión de IMP al estado enzimático de baja concentración es menos exotérmico que cuando la unión es al estado enzimático de alta concentración.

Según se discutió en el capítulo V, la agregación de la enzima en presencia de AMP se ve fuertemente afectada por esta transición conformacional, por lo que se ha investigado el comportamiento de los nucleótidos estudiados en este sentido.

Los experimentos de ultracentrifugación llevados a cabo (véanse métodos) muestran que N_6 -metil-AMP y 1-N-metilAMP presentan un comportamiento idéntico al encontrado para AMP. Ambos agregan completamente la enzima a tetramero (12,8-13,2) S, si la concentración de-

ésta es igual o superior a 2,67 mg/ml. A una concentración de enzima igual a 1.0 mg/ml. ambos son incapaces de tetramerizar la fosforilasa b, a la que llevan a un estado dímero que posee un coeficiente de sedimentación de (8.9-9.1) S.

La enzima en presencia de IMP 10^{-2} M migra en un solo pico de coeficiente de sedimentación igual a 9.1S a una concentración de enzima igual a 1.0 mg/ml y con un coeficiente de sedimentación 3.6 S a una concentración de fosforilasa b igual a 5,0 mg/ml.

En la Tabla XI se han resumido los datos de las entalpías de interacción de la fosforilasa b con los nucleótidos estudiados.

Discusión:

Los resultados expuestos demuestran que la interacción con la enzima de los análogos de AMP estudiados no es la misma en todos los casos, confirmando las conclusiones obtenidas por estudios cinéticos. No obstante, las modificaciones químicas realizadas en el anillo de adenina, (excepto IMP) sólo producen pequeñas alteraciones en la actividad catalítica. No ocurre así en la acción estructural de AMP, revelada por los datos calorimétricos. Los resultados obtenidos por métodos cinéticos indican que el grupo amino y el N-1, de la adenina libre no son imprescindibles para el proceso de activación, pudiendo ser sustituidos por otros grupos, -

TABLA XI

Entalpías de interacción nucleótido-fosforilasa b, por encima y por debajo de la concentración crítica de enzima.

Entalpías de transición conformacional (25°C)

Nucleótido	$-\Delta H$ (baja concentración)	$-\Delta H$ (alta concentración)	ΔH (transición)	(a) ΔH_t (n)
AMP	695 ± 25	366 ± 4	329 ± 30	429 ± 34
N ⁶ metil AMP	670 ± 40	350 ± 15	320 ± 35	320 ± 39
1-metil AMP	480 ± 20	300 ± 20	180 ± 40	280 ± 44
IMP	314 ± 10	425 ± 15	$-(111 \pm 30)$	0

(a) $\Delta H_t(n)$, entalpía neta de transición: $\Delta H_t(n) = \Delta H_{app} + \Delta H_{dil}$

ΔH_{dil} es la entalpía de dilución: $E_2 \rightarrow E'_2$

como se detalló anteriormente. Por otra parte, la cooperatividad que muestra el proceso catalítico no se ve afectada prácticamente en los análogos (N_6 -metil-AMP y 6C1PRP) pero sí en el caso de 1-N-metilAMP. Desde un punto de vista estructural, la cooperatividad en las transiciones conformacionales producidas por la molécula de AMP es fuertemente sensible a las alteraciones citadas. Los resultados cinéticos y calorimétricos demuestran que AMP debe presentar dos facetas independientes en su acción sobre la fosforilasa b:

- a) Una estrictamente estructural.
- b) Otra de acción directa, aunque no sencilla, sobre el mecanismo catalítico.

A partir de los resultados microcalorimétricos expuestos, parece claro que la base del nucleótido juega un papel director en la acción estructural del mismo sobre la enzima, dada la gran sensibilidad que la enzima muestra ante pequeñas alteraciones en la base púrica como lo demuestran los resultados expuestos y otros recientemente publicados (124). Los resultados microcalorimétricos demuestran que el grupo amino en el C(6) es necesario para preservar la cooperatividad asociada a los cambios conformacionales producidos por AMP en la fosforilasa b al unirse a los sitios de débil afinidad. El papel que desempeñan los dos hidrógenos del grupo amino aún no es conocido. Puesto que este segundo sitio parece ser que está implicado en el proceso

catalítico - véase el capítulo V- la cooperatividad - que presenta la cinética de activación no ha de estar producida por los mismos grupos del activador alostérico,

No obstante, es preciso recordar que en las experiencias cinéticas se hallan presentes fosfato y glucógeno, que afectan fuertemente a la afinidad de AMP hacia esta clase de sitios de menor afinidad sin alterar significativamente la afinidad de la primera clase de sitios. Este hecho puede llegar a producir la saturación del segundo tipo de sitios en el mismo intervalo de concentraciones que el primero - fuertemente cooperativo en todos los casos- haciendo que la curva de velocidades iniciales en función de la concentración de nucleótido, presente una sola región de saturación con alta cooperatividad positiva.

El esquema conformacional enzimático propuesto en el capítulo V, a 25°C, parece ser seguido tan solo por 1-N-metilAMP, ya que el tratamiento teórico de la curva entálpica de este último nucleótido a 2,67 mg/ml es formalmente idéntico al preciso para describir la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP. Como se señaló en resultados, la saturación de los sitios de menor afinidad por 1-N-metilAMP presenta una menor cooperatividad intersitios- que para AMP, indicando que el N(1) del anillo de adenina ha de desempeñar un importante papel en la trans

misión de interacciones homotrópicas. Por otra parte, los estados conformacionales alcanzados por la acción de 1-N-metilAMP sobre la enzima han de ser diferentes a los inducidos por AMP puesto que las magnitudes entálpicas medidas son sensiblemente diferentes (véase la tabla IX). Puesto que la actividad catalítica máxima del complejo (1-N-metilAMP-fosforilasa b) es muy similar a la del complejo (AMP-fosforilasa b), el estado dimérico E_3 y el tetrámero han de ser muy similares en ambos casos. Basándonos en esta consideración, hemos de concluir que el estado E_1 inducido por 1-N-metilAMP ha de ser muy diferente al inducido por AMP, estando mucho más desfavorecido, como lo demuestra el alto valor de $^{(1)}L_0$ obtenido para 1-N-metilAMP, respecto del valor obtenido para AMP. Las constantes $^{(2)}k_R$ obtenidas para AMP y 1-N-metilAMP son iguales dentro del error experimental, sin embargo los estudios cinéticos conducen a muy diferentes valores. (véase tabla V). Lógicamente, esta diferencia ha de ser debida a la diferente acción del glucógeno y fosfato sobre los estados conformacionales inducidos por ambos nucleótidos.

Los nucleótidos 6C1PRP y N_6 -metilAMP han de conducir, en la primera transición alostérica, a la enzima hacia un estado similar al E_3 (inducido por AMP), como lo prueban su capacidad de tetramerizar por unión directa del análogo de AMP a la clase de sitios de menor afinidad. La saturación de esta clase de sitios de menor

afinidad no presenta características alostéricas, de acuerdo con la no implicación del equilibrio transconformacional $E_1 \rightleftharpoons E_3$ en dicho proceso. Como se analizó en los resultados microcalorimétricos, la descripción teórica de los datos experimentales obtenidos para la saturación de la primera clase de sitios de unión exige una alta cooperatividad entre 4 centros. Estas necesidades formales en el tratamiento teórico de los datos calorimétricos corroboran las hipótesis enunciadas en la discusión del apartado IV-4. Según aquéllas este tipo de interacción puede entenderse considerando una fuerte interacción interdímeros, mediante la acción del nucleótido. Esta interacción interdímeros exige la presencia del N(1) de la adenina libre ya que la acción de 1-N-metilAMP no puede ser descrita teóricamente por este mecanismo. Por otra parte, se ve favorecida al aumentar la capacidad donadora de electrones en el grupo sustituyente en el C(6) del anillo de adenina, casos de 6C-PRP y N₆-metil-AMP respecto de AMP, puesto que en AMP esta interacción es mucho más débil que en los nucleótidos señalados. El efecto del sustituyente metilo en N(1) del anillo de adenina puede ser interpretado también en el mismo sentido ya que disminuye la riqueza electrónica π de la base púrica y consecuentemente afectará la capacidad donadora de electrones del grupo amino en C(6).

En base a esta hipótesis puede explicarse la

distinta importancia que el estado conformacional E_1 posee para los análogos estudiados. Si se considera que la transición $E_1 \rightleftharpoons E_3$, crea nuevos centros de unión (dos por dímero) que posibilitan una alta cooperatividad homotrópica entre 4 centros, el estado E_1 no debería hallarse presente en los casos de 6ClPRP y N_6 -metilAMP ya que éstos inducen una muy fuerte interacción interdímeros, - siendo precisa su aparición para alcanzar una fuerte interacción interdímeros en una molécula con menor potencial de transmisión del efecto (AMP) y ha de estar muy desfavorecido en el caso de 1-N-metilAMP, como lo corrobora el valor de $^{(1)}L_0$ obtenido. Esta explicación se ve fuertemente apoyada por los resultados dados en la tabla X. Los valores de ΔS_I° y ΔS_{II}° demuestran la gran importancia que poseen los grupos amino en el C(6) y el N(1) de la adenina en los cambios conformacionales producidos - por AMP en la enzima, apoyando las hipótesis analizadas previamente. Es preciso recalcar que no puede realizarse una exacta correlación entre las propiedades termodinámicas de los complejos nucleótido-enzima, dadas en la tabla X, con los obtenidos por métodos cinéticos, (véase en la tabla VII) debido a la presencia de glucógeno y - fosfato en las experiencias cinéticas.

La importancia de la densidad electrónica en el N del grupo amino del C(6) concuerda plenamente con las conclusiones obtenidas a partir de los resultados ci

néticos.

Los resultados obtenidos para la entalpía de interacción IMP-fosforilasa b muestran la existencia de una sola clase de sitios de unión para este nucleótido, confirmando resultados previos de diálisis (18)- y microcalorimetría (17). Estos resultados indican que el mecanismo de interacción IMP-fosforilasa b se ve ligeramente afectado por la presencia de glicerofosfato (cuyo efecto es similar al del fosfato; véase el apartado IV-1), ya que los datos experimentales analizados presentan ausencia de fenómenos cooperativos en el proceso de saturación entálpica por IMP, en tanto que en presencia de glicerofosfato éstos se manifiestan, aunque débilmente (17). Atendiendo a las conclusiones realizadas previamente puede explicarse esta diferencia - considerando que en tampón glygly IMP interacciona con el estado conformacional E_2 y en tampón glicerofosfato con el estado E_3 , fundamentalmente, explicación que puede asimismo justificar la gran diferencia entálpica -- entre las mesetas de las curvas de valoración de la enzima por IMP en tampón glygly (fig. 38) y en tampón glicerofosfato (17).

La hipótesis realizada al analizar los resultados, de que el calor producido en las primeras regiones de las curvas de valoración entálpica sea fundamentalmente debido a las transiciones conformacionales in-

ducidas por los nucleótidos se ve plenamente confirmada por la relación lineal que existe entre las $K_{1/2}$ calorimétrica para el primer sitio y la $K_{1/2}$ de mitad de protección del grupo "cisteína lento" SH_1 - el que se valora más rápido - (véase la fig. 45). Esta relación de linealidad confirma asimismo la hipótesis de que el grupo -SH sea el que se protege en el cambio conformacional enzimático inducido por el nucleótido (véase la discusión de los resultados cinéticos de este apartado).

Como se puntualizó previamente (cap.V) los valores de $K_{1/2}$ sólo poseen valor comparativo en procesos de saturación si la concentración de enzima se mantiene constante. Si esto no ocurre es preciso considerar la relación moléculas de efector/sitio. Al corregir, en este caso, los valores de $K_{1/2}$ de protección del grupo SH_1 , (Tabla XII) obtenidos para una concentración de enzima igual a 1,0 mg/ml, a una concentración de enzima igual a 2,67 mg/ml (para normalizar la relación moléculas efector/sitio con las calorimétricas) puede observarse que dichos valores coinciden aproximadamente (excepto para IMP) con la concentración de nucleótido precisa para el comienzo de la segunda región de la curva de valoración entálpica de cada nucleótido. Por otra parte, el salto entálpico asociado a la segunda región de las curvas calorimétricas (figs. 35, 36 y 37) es muy elevado, del orden de las entalpías de formación de puentes

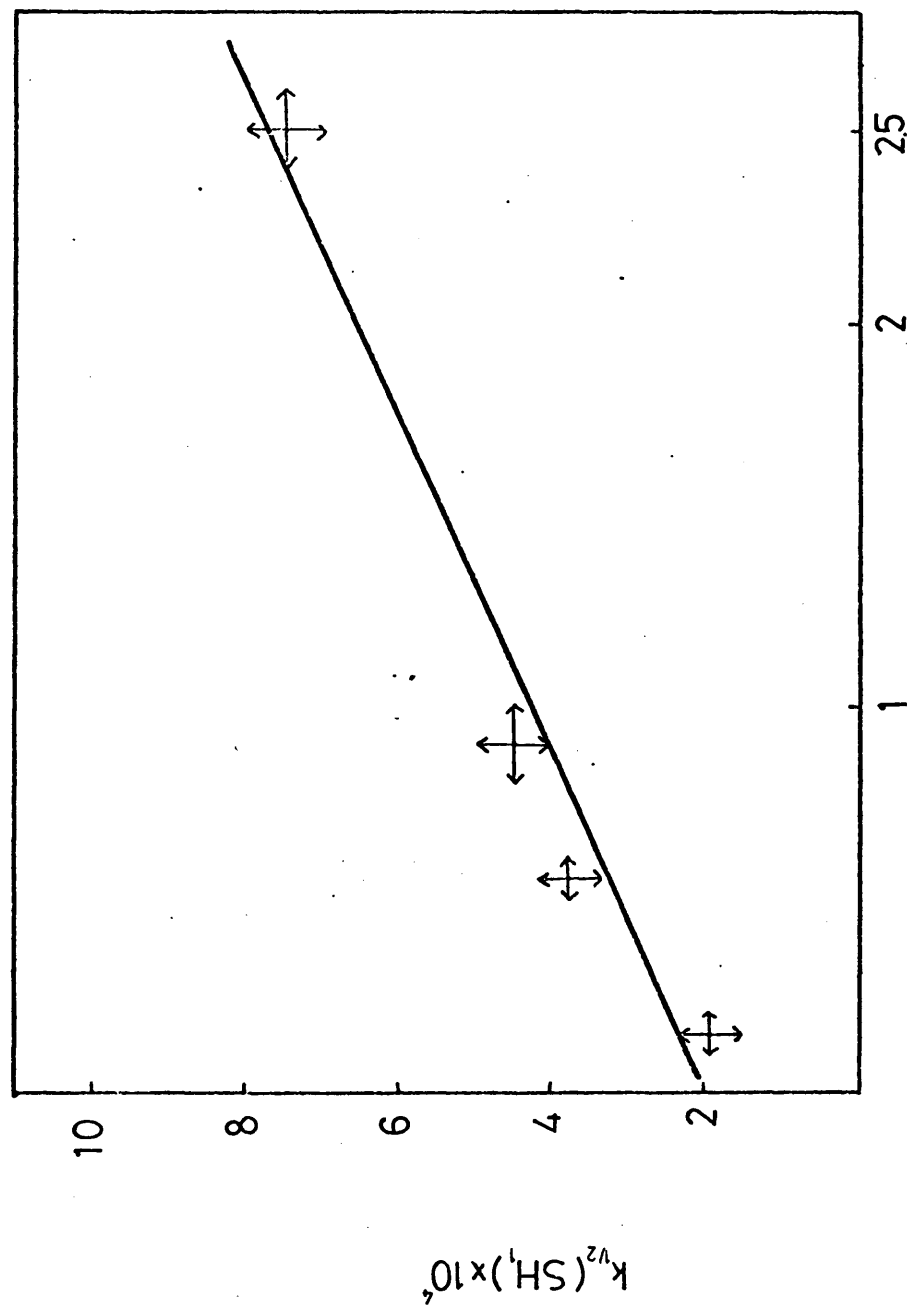


Fig. 45. - Representación de la $K_{1/2}$ de protección del grupo cisteína lento SH1 frente la $K_{1/2}$ calorimétrica para los nucleótidos estudiados.

TABLA XII

Datos cinéticos de los nucleótidos estudiados

Nucleótido	$2,66 \times K_{1/2} (SH_1)^{(a)}$	L_o	K_R
AMP	2×10^{-3}	600	3×10^{-5}
N ⁶ metil AMP	10^{-3}	60	$2,2 \times 10^{-5}$
1-metil AMP	$1,2 \times 10^{-3}$	40	$1,75 \times 10^{-4}$
6 Cl PRP	$1,7 \times 10^{-3}$	240	$2,2 \times 10^{-5}$
IMP	$2,8 \times 10^{-3}$	--	--

(a) El valor de $K_{1/2} (SH_1)$ se ha tomado como la concentración de nucleótido precisa para proteger el SH_1 lento un 50% de la máxima protección que cada nucleótido produce (a 1,0 mg/ml de enzima). El factor 2,66 se ha utilizado para reducir esta concentración de nucleótido a la que posee igual relación molécula nucleótido/sitio a 2,66 mg/ml.

disulfuro ($\Delta H_{(s-s)} = -(284 \pm 4)$ kJ/mol (s-s) (112), lo -
que apoya la probable implicación de la formación de -
puentes disulfuro como consecuencia de la unión de los
nucleótidos a los sitios de menor afinidad.

Los distintos nucleótidos estudiados despla-
zarían a la fosforilasa b, 1,0 mg/ml, al saturar dichos
sitios de menor afinidad, hacia un estado conformacio-
nal dimérico E'_3 (no idéntico para todos ellos), utilizando
una nomenclatura análoga a la seguida con AMP. El -
balance entálpico total de la transición $E'_2 \rightleftharpoons E'_3$ --
para AMP es $\Delta H'_{23} = -(695 \pm 25)$ kJ/mol monómero (véase -
el capítulo V), valor que permitiría explicar la protecci
ción de los dos - SH lentos (protección observada a --
1.0 mg/ml) por monómero considerando la formación de -
dos puentes disulfuro por monómero.

Esta explicación permite entender, además, -
las diferencias en las entalpías globales de transición
en función de la concentración de enzima, considerando
que estas entalpías podrían ser debidas, en su mayor -
parte, a efectos de ruptura de puentes disulfuro. El -
balance neto sería la pérdida de algún o algunos puen-
tes disulfuro al pasar desde un estado E'_3 hasta el te-
trámero, dado el carácter endotérmico de la transición
(excepto IMP que ni conduce al tetrámero ni posee una-
entalpía de transición endotérmica). A partir de los -
resultados expuestos en la tabla XII, se concluye fácil

mente que AMP pierda en la transición $E_3' \longrightarrow Q$ dos puentes disulfuro netos en tanto que los demás nucleótidos sólo pierden uno.

Dado que las entalpías de saturación total de las diferentes curvas entálpicas obtenidas para los nucleótidos estudiados son muy similares, es lógico concluir que el tetrámero inducido por los distintos nucleótidos será siempre el mismo. Los resultados cinéticos corroboran esta idea puesto que todos los nucleótidos citados alcanzan niveles de activación máxima muy próximas en la fosforilasa b, recordemos que los estados enzimáticos activos son E_3 y el tetrámero, según se concluyó en el capítulo V. Por tanto, las diferencias en las entalpías de transición medidas, han de provenir necesariamente de diferencias en los estados E_3' inducidos en la enzima por los distintos nucleótidos. Los valores entálpicos dados en la tabla XII confirman esta conclusión, ya que la entalpía global de la transición $E_2' \rightleftharpoons E_3'$ (véase el esquema conformacional dado en el capítulo V) es mayor para AMP que para todos los demás nucleótidos estudiados, oscilando las diferencias entálpicas entre $(360-480) \text{ kJ (mol dímero)}^{-1}$. Este puente disulfuro en defecto en los estados conformacionales E_3' inducidos por los distintos análogos citados respecto del estado E_3' inducido por AMP puede ser correlacionado, en el caso de 1-N-metilAMP, con la pequeña protección de los -SH lentos que éste produce en la enzima

contra DTNB. Puede considerarse como hipótesis que la protección de los grupos -SH lentos tiene lugar por formación de un puente disulfuro en la que el N-(1) del anillo de adenina ha de participar activamente. Por otra parte, la sustitución de uno de los hidrógeno del grupo amino del anillo de adenina por un grupo metilo o la sustitución del grupo amino por un grupo hidróxio provoca la no formación de otro puente disulfuro en E_3' alterando el balance neto en la reorganización estructural.

Como puede observarse en la tabla XII la $K_{1/2}$ de semiprotección del -SH₁ para IMP coincide con la $K_{1/2}$ calorimétrica para el primer sitio, una vez corregida la primera para reducir ambos parámetros a relación de moléculas de IMP/sitio. Esto indica claramente que en este caso en el que no existe cooperatividad homotrópica en el proceso de saturación, la curva de valoración entálpica se manifiesta como una función de saturación del proceso de unión del ligando.

Las pequeñas diferencias observadas en los intervalos de concentración enzimática en los que tiene lugar la transición conformacional inducida por la concentración (<0.5 mg/ml) pueden explicarse, en términos de un diferente posicionamiento de la molécula de nucleótido en el complejo (enzima-nucleótido). Esta hipótesis atribuiría a la región de unión de los nucleó

tidos en la enzima un importante papel en la transición conformacional (dependiente de la concentración enzimática) viéndose apoyada por el hecho experimental de que 1-N-metilAMP presenta una desviación clara en la concentración enzimática de transición, ya que difiere claramente de AMP en sus efectos conformacionales locales -- (véanse los resultados cinéticos).

B) Acción de análogos de AMP : inhibidores y activadores débiles de la fosforilasa \underline{b}

Se ha estudiado el comportamiento cinético (estudios de velocidad inicial y de protección de las cisteínas lentas contra DTNB) y se ha realizado un estudio microcalorimétrico de la acción, sobre la enzima, de los análogos siguientes: 2'dAMP, 2'dIMP, AMP2' y AMP3'.

I.- Resultados cinéticos

Se han obtenido las constantes de mitad de activación (K_a) o de inhibición (K_i), en gly-gly, de los nucleótidos estudiados, ya que en la bibliografía se dan en tampón glicerofosfato (113, 114). En la tabla XIII se han resumido estos valores, obtenidos a 25°C a concentraciones fijas de sustratos. Puede apreciarse que la alteración en la posición del grupo fosfato afecta fuertemente a la fijación del nucleótido a la enzima, así como a la activación de la misma, puesto que AMP2' y AMP3' son inhibidores de la actividad residual enzimática. Los 2' deoxiderivados presentan constantes de mitad activación muy similares entre sí y próximas a la de IMP.

En la fig. 46 puede observarse como afecta el fosfato a la inhibición de la actividad residual de la fosforilasa \underline{b} por AMP3', a 25°C. El proceso de inhibición no presenta características de cooperatividad positiva y

TABLA XIII

Datos cinéticos a 25° C

[Fosfato] = $9,6 \times 10^{-3}$ M		[Glucógeno] = $2,5 \times 10^{-3}$ M glucosa	
Nucleótido	K_a	K_i	% activación o inhibición máxima.
AMP	$(6,5 - 7,0) \times 10^{-5}$		100
IMP	$(9,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		13
2' dAMP	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		4,7
2' dIMP	$(6,4 \pm 0,2) \times 10^{-4}$		0,8
AMP-2'		$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	30
AMP-3'		$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	22

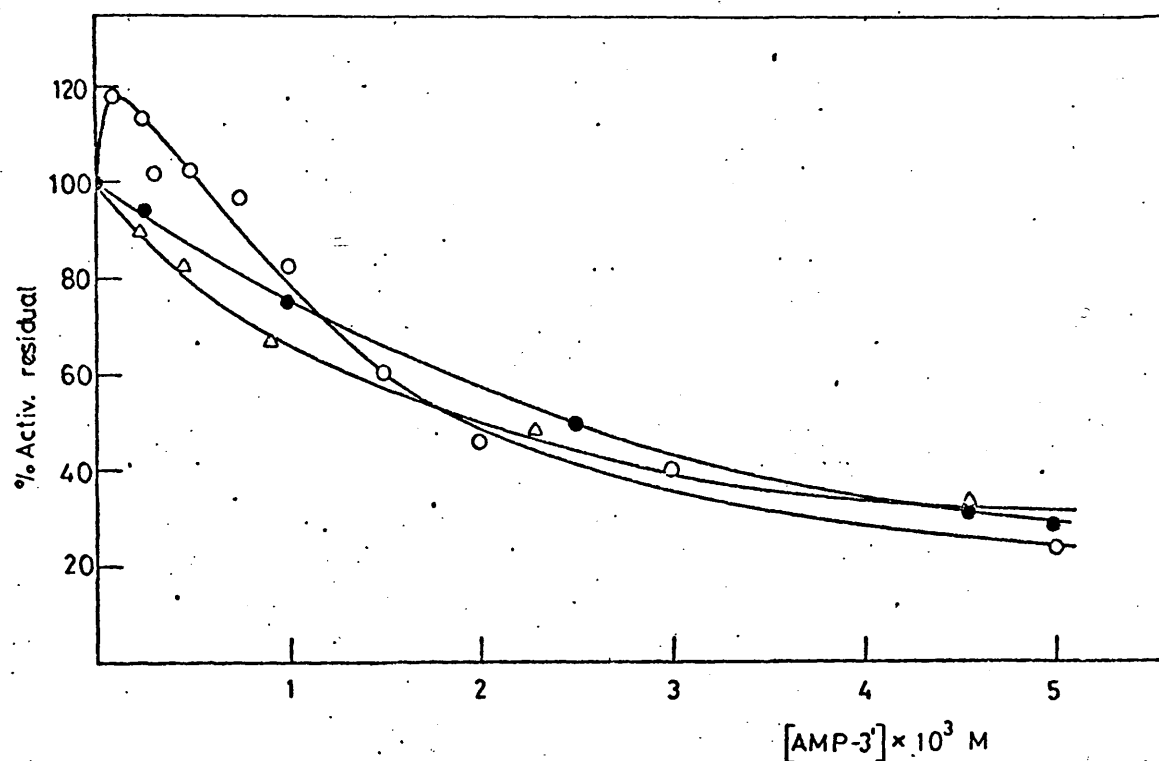


Fig. 46. - Efecto del fosfato en la inhibición de la enzima producida por el AMP 3'. Concentraciones de fosfato: Δ 3 mM, O 12mM, ● 54 mM

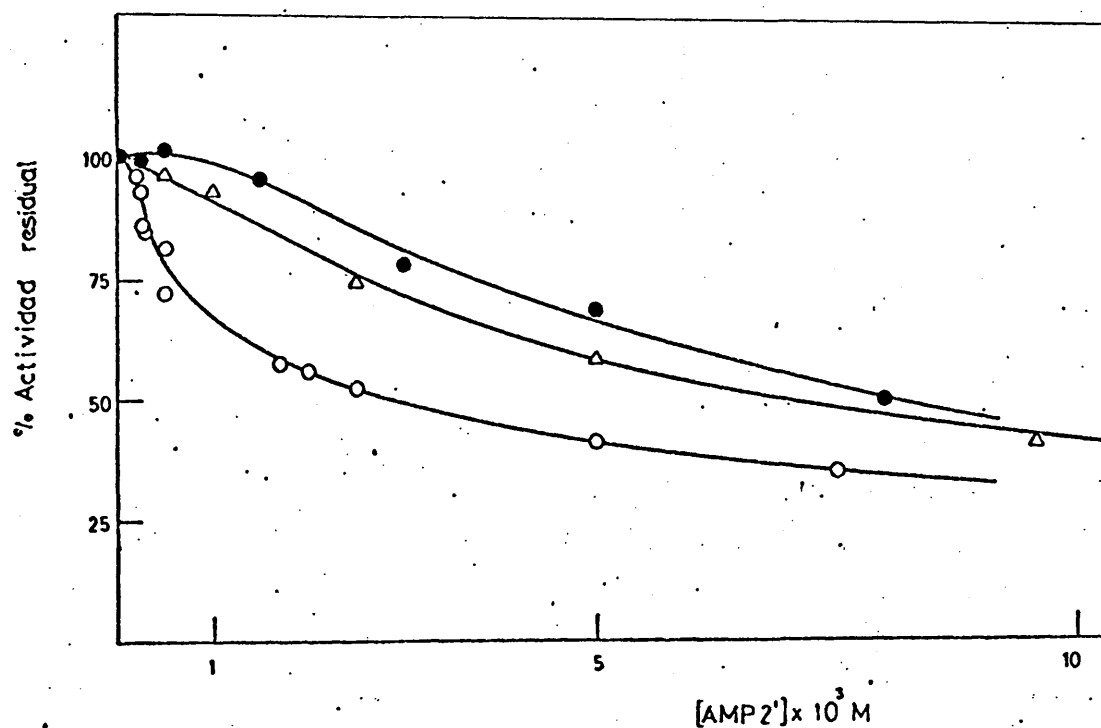


Fig. 47. - Efecto del fosfato en la inhibición de la enzima producida por el AMP 2'. Concentraciones de fosfato: Δ 3 mM, O 12 mM, ● 54 mM.

la inhibición máxima (25-35% de la actividad residual) es prácticamente independiente de la concentración de fosfato (a una concentración de fosfato igual a $9.6 \times 10^{-3}M$)(fig. 46) . Puede observarse que hasta $2,5 \times 10^{-4}M$ de AMP3' éste produce una débil activación de la fosforilasa b en tanto que a concentraciones superiores produce una fuerte inhibición que predomina sobre el efecto anterior.

La fig. 47 muestra la inhibición de la actividad residual de la fosforilasa b por AMP2' a diferentes concentraciones de fosfato. El porcentaje máximo de inhibición no varía notablemente en función de la concentración de fosfato. No obstante, a diferencia de lo ocurrido con AMP3' exhibe características de cooperatividad positiva, dependiente de la concentración de fosfato.

En la figura 48 se dan los resultados obtenidos para el débil proceso de activación inducido por 2'dIMP en la fosforilasa b, que es dependiente de la concentración de fosfato. Puede apreciarse nuevamente el efecto anómalo producido por el fosfato a una concentración $9.6 \times 10^{-3}M$. Excepto a esta concentración de fosfato, el nivel máximo de activación no varía sensiblemente. El proceso, contrariamente a los resultados comunicados en la bibliografía (69) presenta características de cooperatividad positiva y desaparece a altas concentraciones de fosfato ($4.3 \times 10^{-2}M$). Este comportamiento es idéntico al

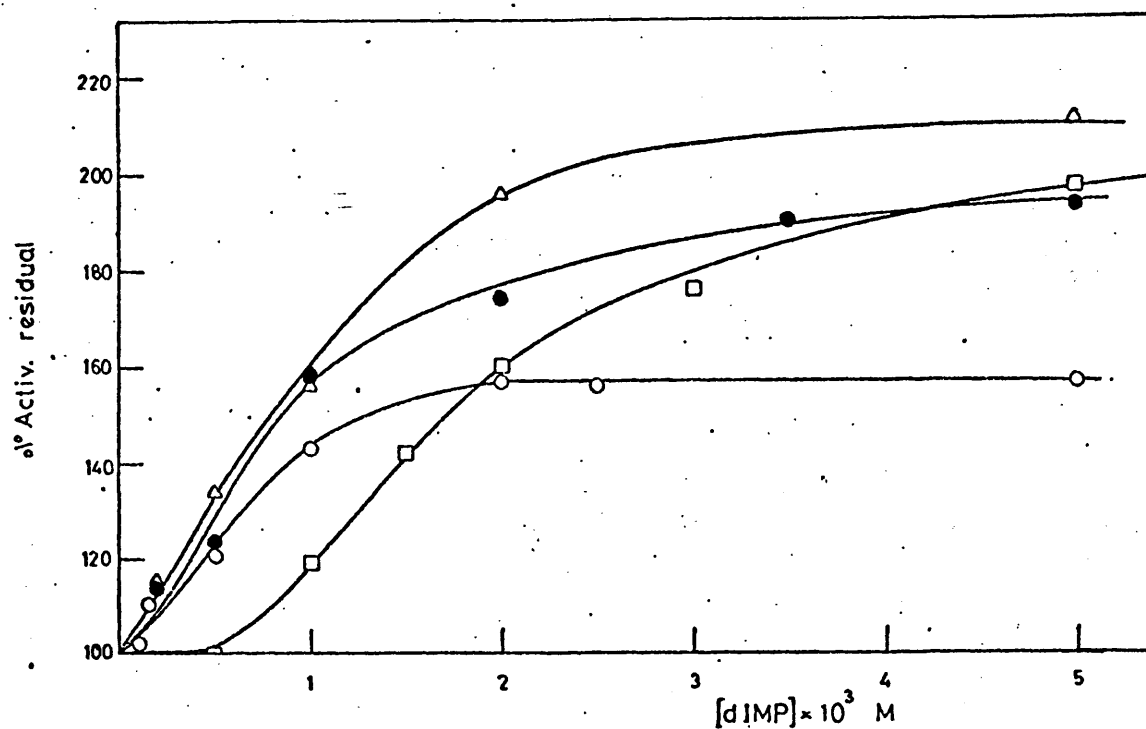


Fig. 48. - Efecto del fosfato en la activación producida por el dIMP. Concentraciones de fosfato: □ 2,4 mM, ○ 9,6 mM, ● 14 mM, Δ 43 mM

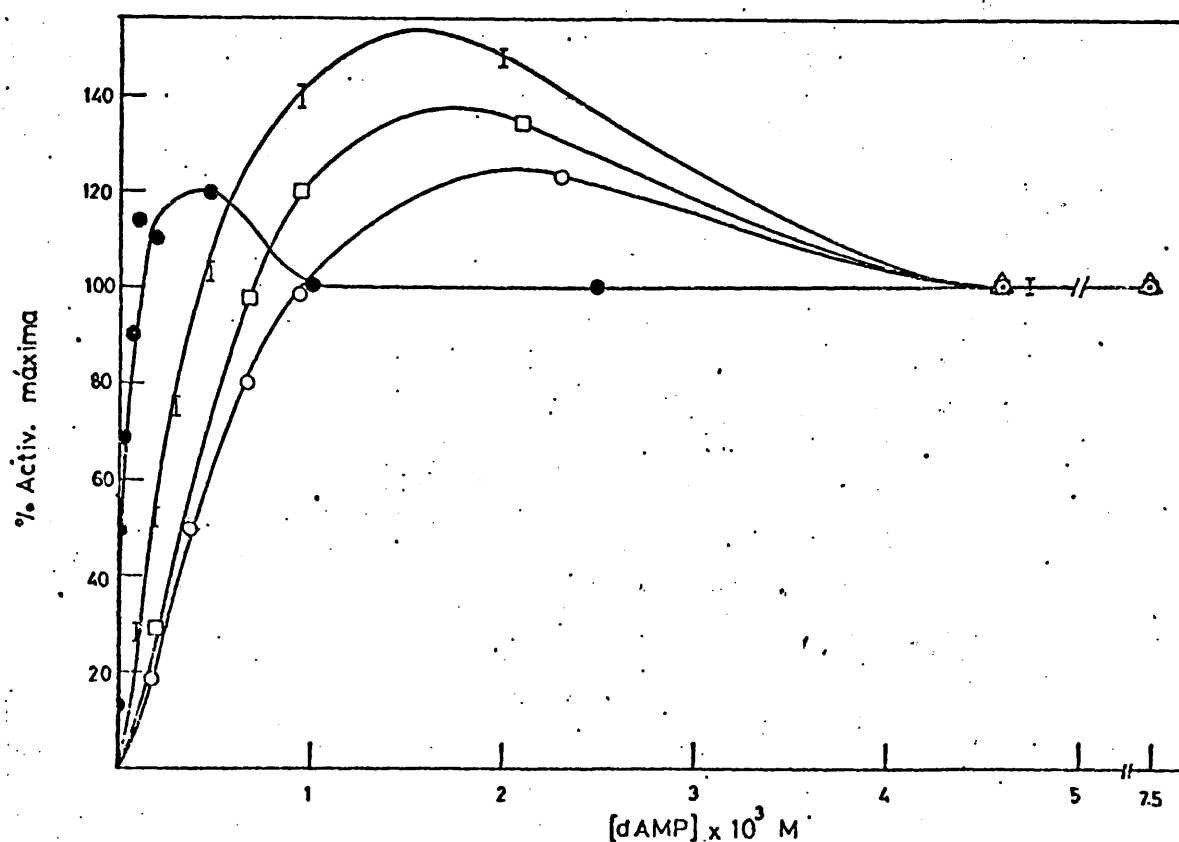


Fig. 49. - Efecto del fosfato en la activación de la enzima producida por el dAMP. Concentraciones de fosfato: □ 1,4 mM, ┘ 2,4 mM, ○ 9,6 mM, ● 43 mM.

observado en el proceso de inhibición por AMP2'.

Los resultados obtenidos con 2'dAMP a diversas concentraciones de fosfato se muestran en la fig.49. Puede apreciarse en la misma que a elevadas concentraciones de 2' dAMP se produce una disminución en la máxima activación que es dependiente de la concentración de fosfato y que al igual que la activación máxima alcanzada, sigue un comportamiento diferente a concentraciones de fosfato inferiores o superiores a $9.6 \times 10^{-3}M$, en completo paralelismo a lo ocurrido con los otros nucleótidos estudiados.

En la tabla XIV se han resumido los valores de las K_a y K_i de los distintos nucleótidos analizados a diferentes concentraciones de fosfato.

El proceso de activación por 2'dAMP, hasta concentraciones inferiores a las de comienzo de la segunda región de las curvas mostradas en la fig. 49, sigue un comportamiento describible por el "modelo concertado" con unión exclusiva al estado R, considerando dos sitios de unión por dímero (unidad funcional) (fig.50). Siguiendo el método aplicado al análisis de los datos cinéticos dados en el apartado anterior (VI-I), se obtiene una constante de disociación del nucleótido del estado enzimático R, $k_A = (7.2) \times 10^{-5}M$ y una constante de equilibrio transconformacional, $L_0 = 150 - 200$.

TABLA XIV

Efecto del fosfato sobre K_a ó K_i a 25°C

Nucleótido	K_a ó K_i			
	[Fosfato] = $2,4 \times 10^{-3}M$	$9,6 \times 10^{-3}M$	$1,44 \times 10^{-2}M$	$4,32 \times 10^{-2}M$
AMP 2'	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	--	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
AMP 3'	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	--	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
2' dIMP	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(5,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(8,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(9,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$
2' dAMP	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(4 \pm 2) \times 10^{-5}$

[Glucógeno] = $2,5 \times 10^{-3}M$ glucosa

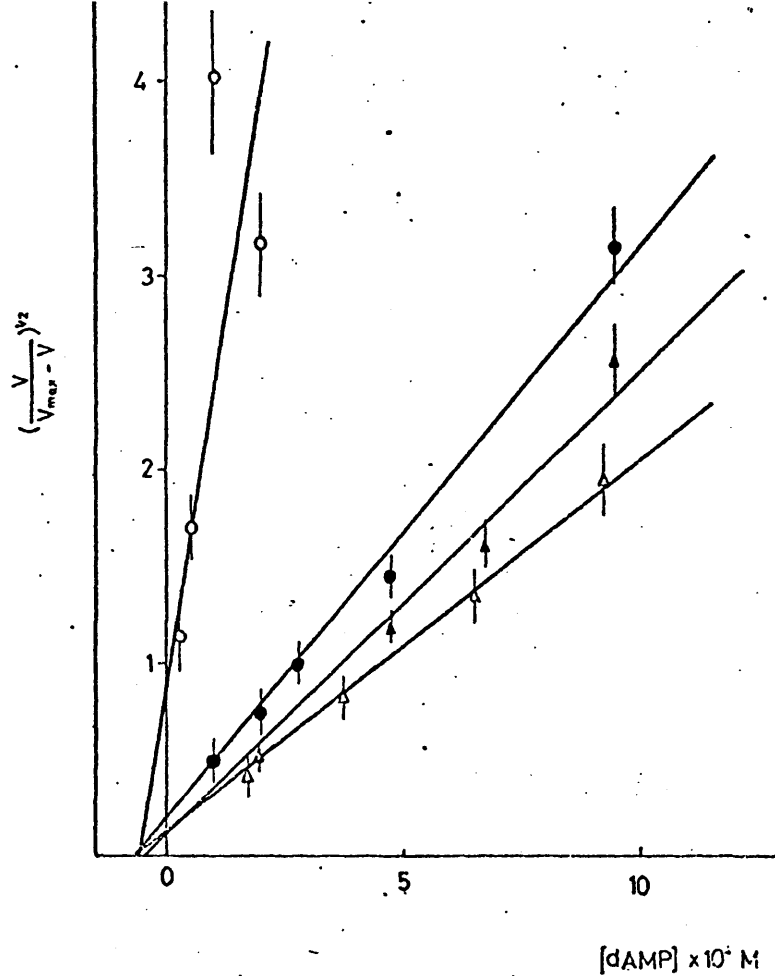


Fig. 50. - Representación de $(V/V_{\max} - V)^{1/2}$ en función de la concentración de dAMP en diferentes concentraciones de fosfato: O: 43 mM, ●: 9,6 mM, ▲: 2,4 mM y △: 1,4 mM.

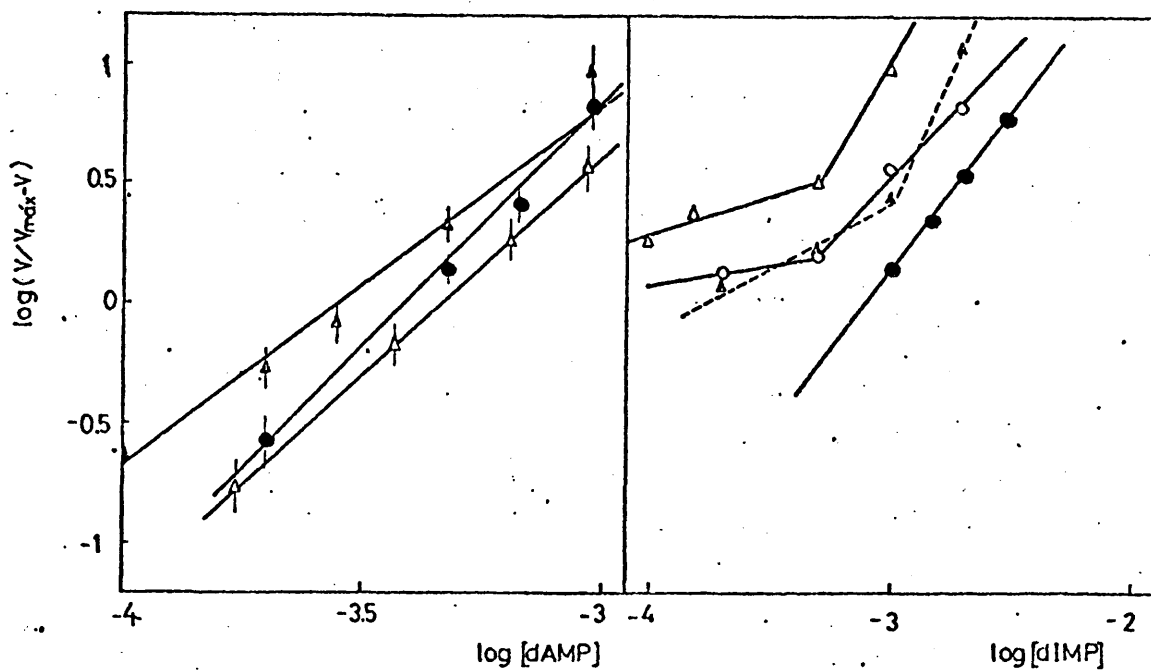


Fig. 51. - Representación de Hill de los datos de las figuras 49 y 48

El 2'dIMP no sigue el mismo mecanismo que 2'dAMP y los activadores fuertes en la activación de la fosforilasa b, ya que no sigue el modelo concertado.

Una representación de Hill de los datos de velocidades iniciales, de la primera región, de las curvas de activación por 2'dAMP (fig.49) se muestra en la figura 51a. Al elevar la concentración de fosfato se produce una disminución de la cooperatividad homotrópica entre los sitios de 2'dAMP ya que las pendientes de las rectas varían desde 2,0 para $2,4 \times 10^{-3}M$ de fosfato, hasta 1,1 a una concentración de fosfato igual a $4.3 \times 10^{-2}M$. La constante global que se obtiene para la formación del complejo 2'dAMP-fosforilasa b, a partir de la fig.51a, sigue un proceso singular, similar al seguido por los niveles de activación máxima, en función de la concentración de fosfato.

En la fig. 51b se ha efectuado una representación de Hill de los datos experimentales obtenidos con 2'dIMP. A baja concentración de 2'-dIMP el proceso de activación presenta cooperatividad negativa ($n=0,2 - 0,5$), pasando al elevar la concentración de nucleótido a exhibir cooperatividad homotrópica positiva entre dos centros ($n = 1.1 - 2.0$) siendo la concentración de 2'-dIMP a la que se produce el cambio de cooperatividad, dependiente de la concentración de fosfato. Así, a una concentración de fosfato igual a $2,4 \times 10^{-3}M$ la cooperati-

vidad del proceso no sufre un abrupto cambio en función de la concentración de 2'-dIMP, mostrando un valor de $n=1.33$, que indica la existencia de una débil cooperatividad positiva entre dos centros. Las constantes globales de formación del complejo 2'-dIMP-fosforilasa b son también función de la concentración de fosfato (fig. 51 b) presentando un efecto similar al observado con 2'-dAMP, AMP-2' y AMP3'.

Efecto de la temperatura

En la fig. 52 se ha representado $\log (1/K_a)$ o $\log (1/K_i)$ frente a $1/T$ para los diferentes nucleótidos estudiados (incluyéndose los resultados de velocidades iniciales obtenidos con IMP).

En la tabla XV se han resumido los valores de las energías de activación para los distintos nucleótidos a temperaturas superiores e inferiores a $(16-18)^{\circ}\text{C}$ que es el intervalo de temperaturas en el que todos, excepto 2'-dAMP, presentan una discontinuidad en la representación de la figura 52. En esta tabla se han incluido los valores obtenidos para AMP. Estos resultados confirman la hipótesis, discutida ya para los activadores fuertes, de que la temperatura de transición no se ve modificada apreciablemente por alteraciones en el entorno de los sitios de unión de AMP en la enzima.

La figura 53 muestra que la activación a ba-

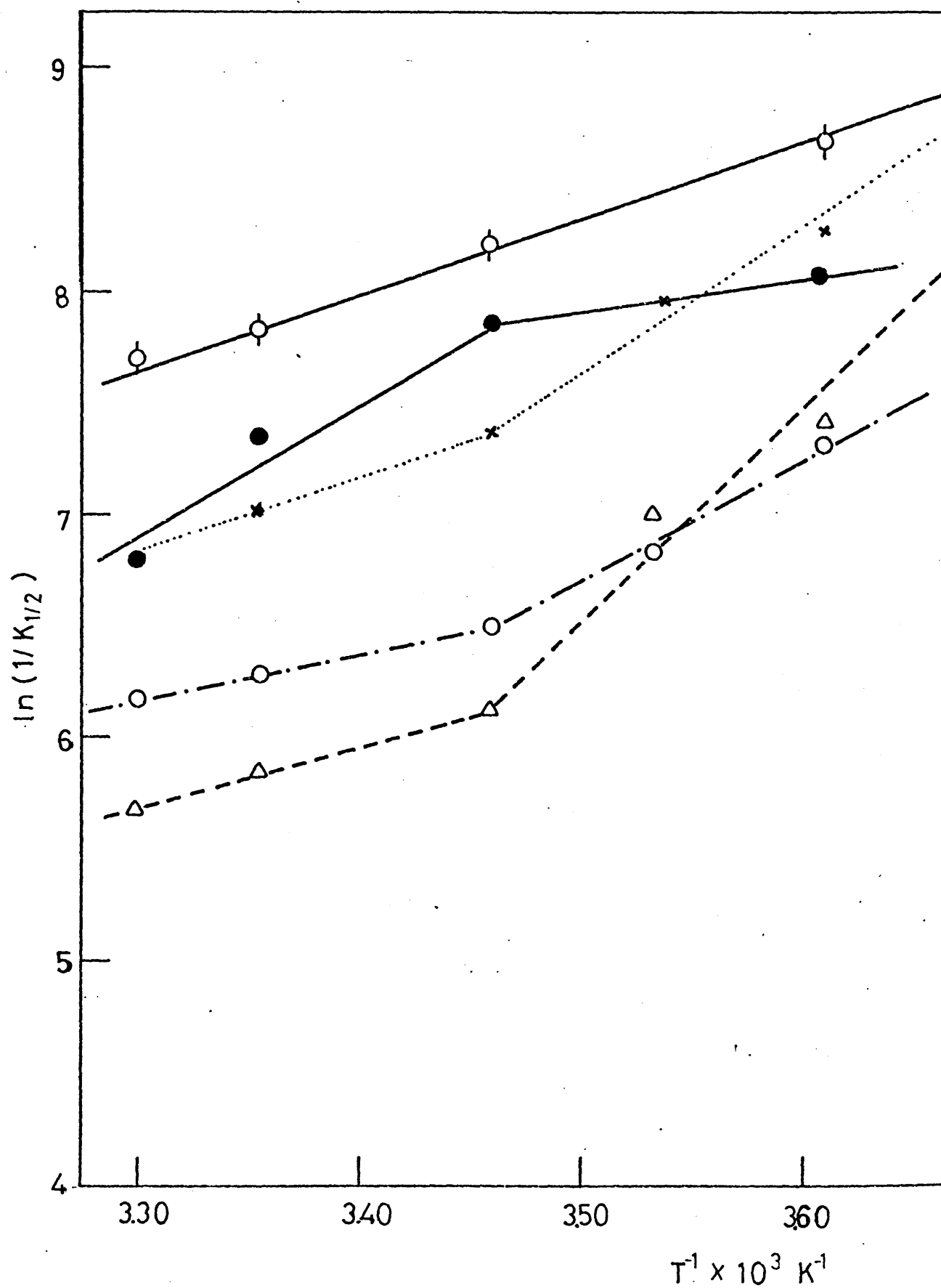


Fig.52.- Variación de la $K_{1/2}$ de activación máxima en función del inverso de la temperatura. \circ : dAMP, \bullet : dIMP, \times : IMP, \circ : AMP3', Δ : AMP2'.

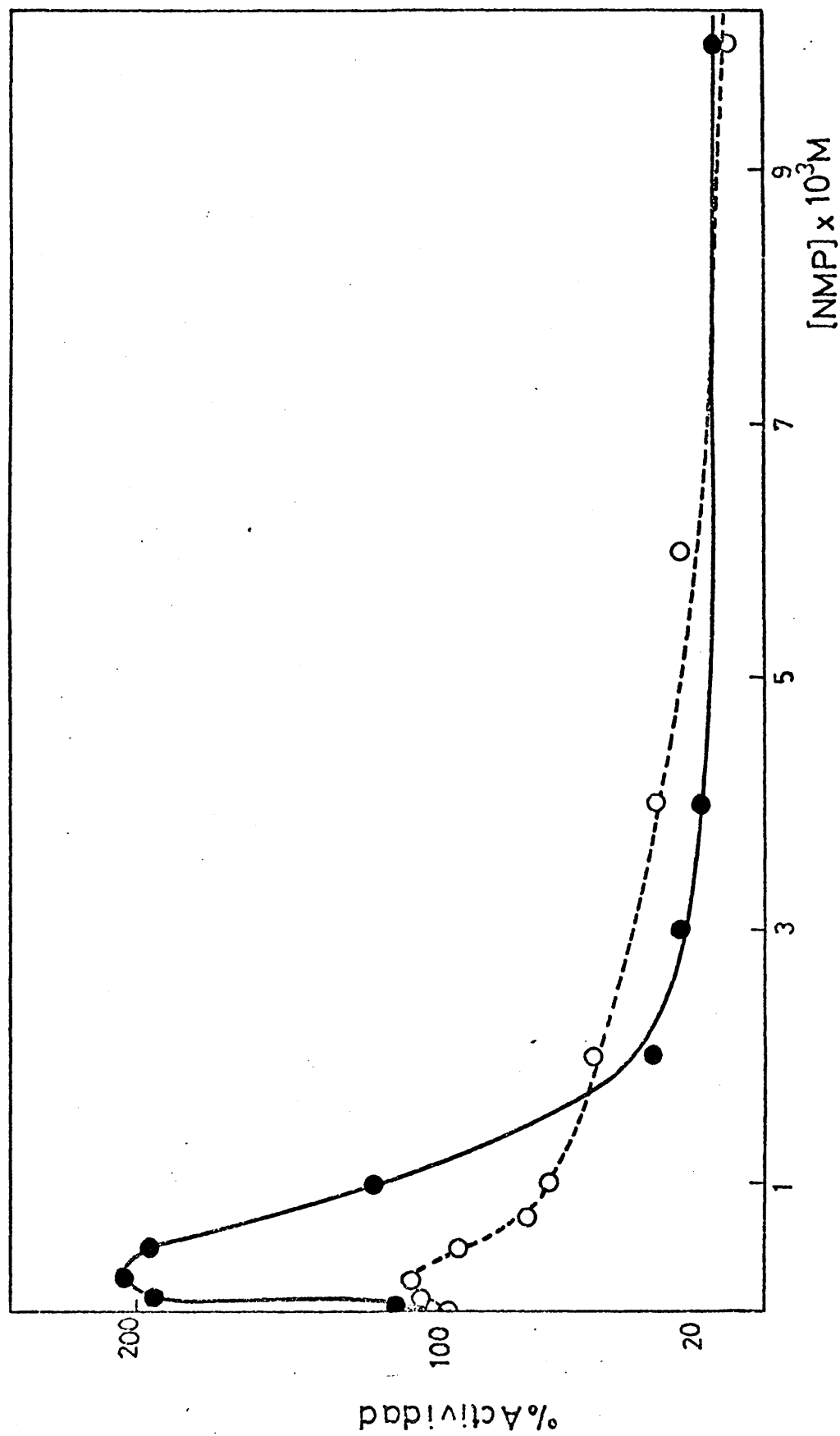


Fig. 53.- Efecto de la temperatura en el proceso de activación de la fosforilasa b por AMP 3'. O = 25°C.
O = 16°C.

TABLA XV

Entalpias aparentes del proceso de activación o inhibición por los nucleótidos estudiados

Nucleótido	$-\Delta H$ (alta temperatura)	$-\Delta H$ (baja temperatura)
	kJ/mol dímero	
AMP	(86 ± 2)	(39 ± 2)
IMP	(28 ± 1)	(56 ± 2)
2' dAMP	(28 ± 1)	
2' dIMP	(47 ± 2)	(12,5 ± 0,5)
AMP 2'	(25 ± 1)	(40 ± 1)
AMP 3'	(8,4 ± 0,4)	(23 ± 1)

las concentraciones de AMP3' aumenta al disminuir la temperatura (16°C), presentando una mayor amplitud de rango de concentración en el que actúa como activador, llegando a los mismos niveles de activación máxima que dIMP.

Valoración de las cisteínas lentas por DTNB

Los resultados obtenidos se han representado en las figuras 54, 55 y 56. Pueden obtenerse de ellos las siguientes conclusiones:

- a) Las curvas de protección de las dos "cisteínas lentas" presentan un hábito diferente, sigmoideo o hiperbólico, para los diferentes nucleótidos.
- b) Todos los nucleótidos estudiados protegen a ambos -SH en un 50% respecto de su velocidad de reacción a concentración cero de nucleótido, excepto 2'-dAMP que los protege un 90% e IMP que protege el -SH₁ en un (35-40)%.

En la tabla XVI se han resumido los valores de $K_{1/2}(SH_1)$ y $K_{1/2}(SH_2)$. El porcentaje de protección máxima: P , de cada -SH se ha obtenido a partir de la relación, r , entre la constante de velocidad de valoración a alta concentración de nucleótido y la constante de velocidad de valoración de ese -SH por DTNB cuando se halla la enzima sola en solución:

$$P = (1-r) \times 100$$

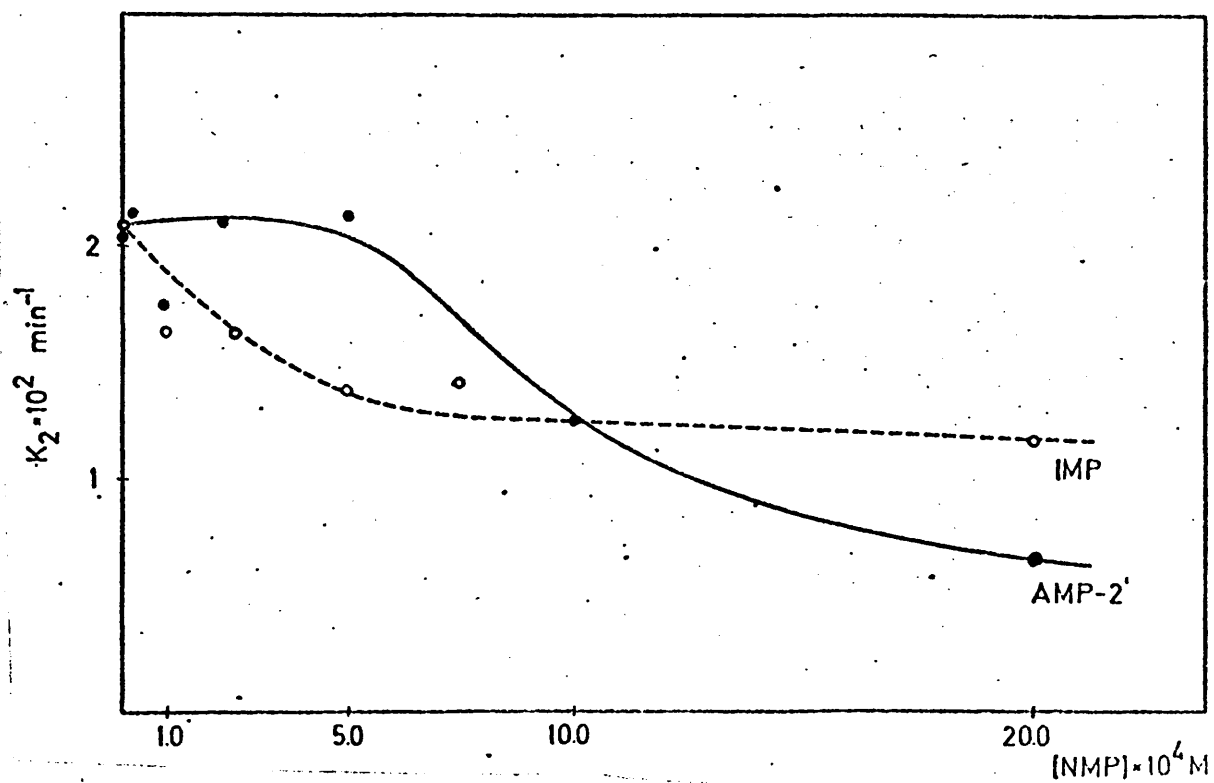
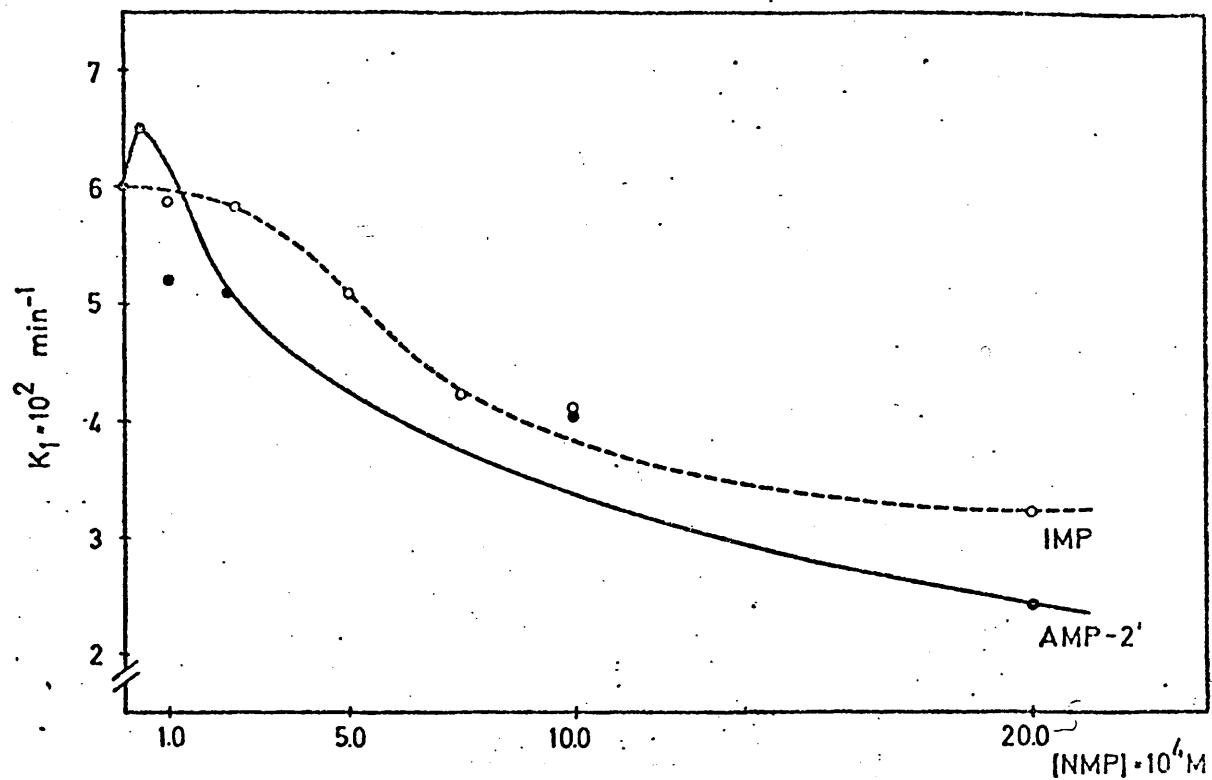


Fig. 54. - Dependencia de las constantes de velocidad K_1 y K_2 de valoración de SH en función de la concentración de nucleótido.

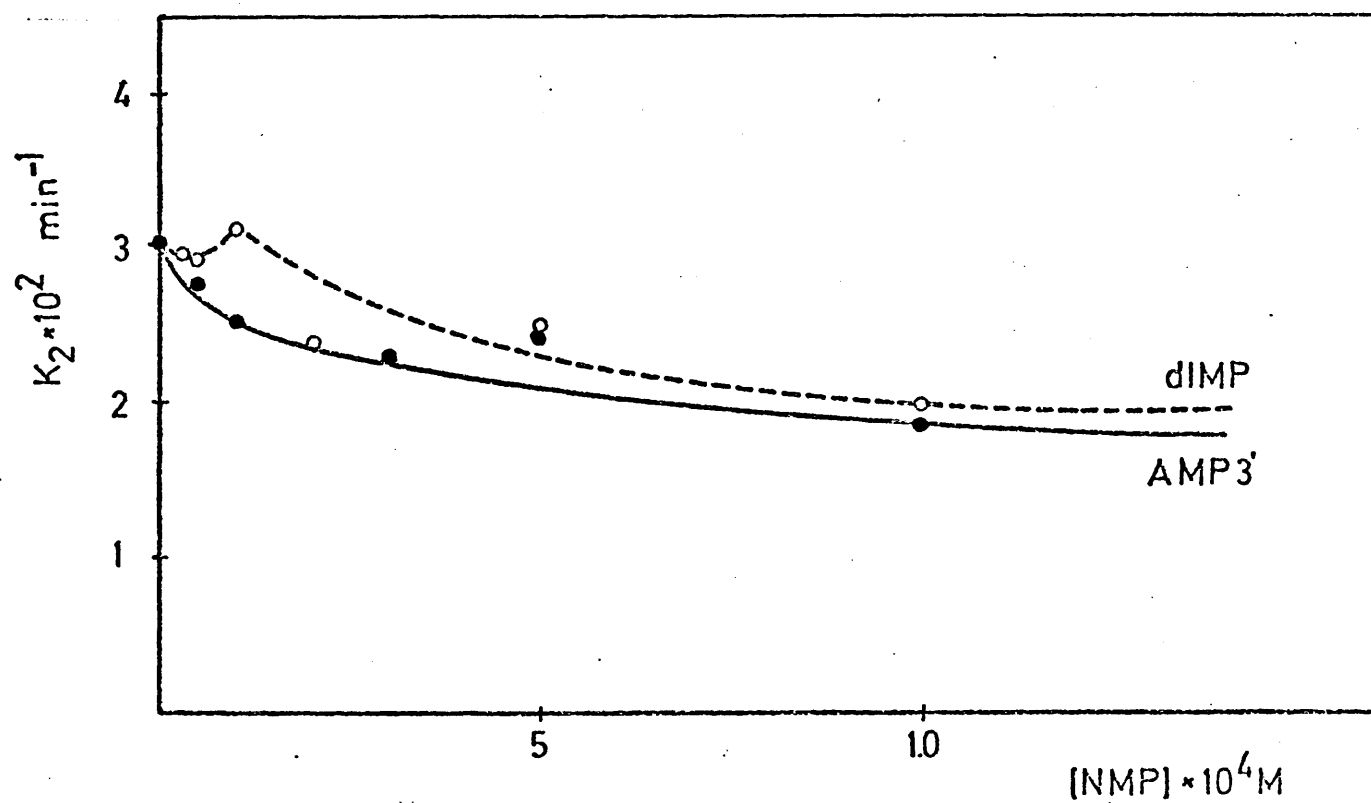
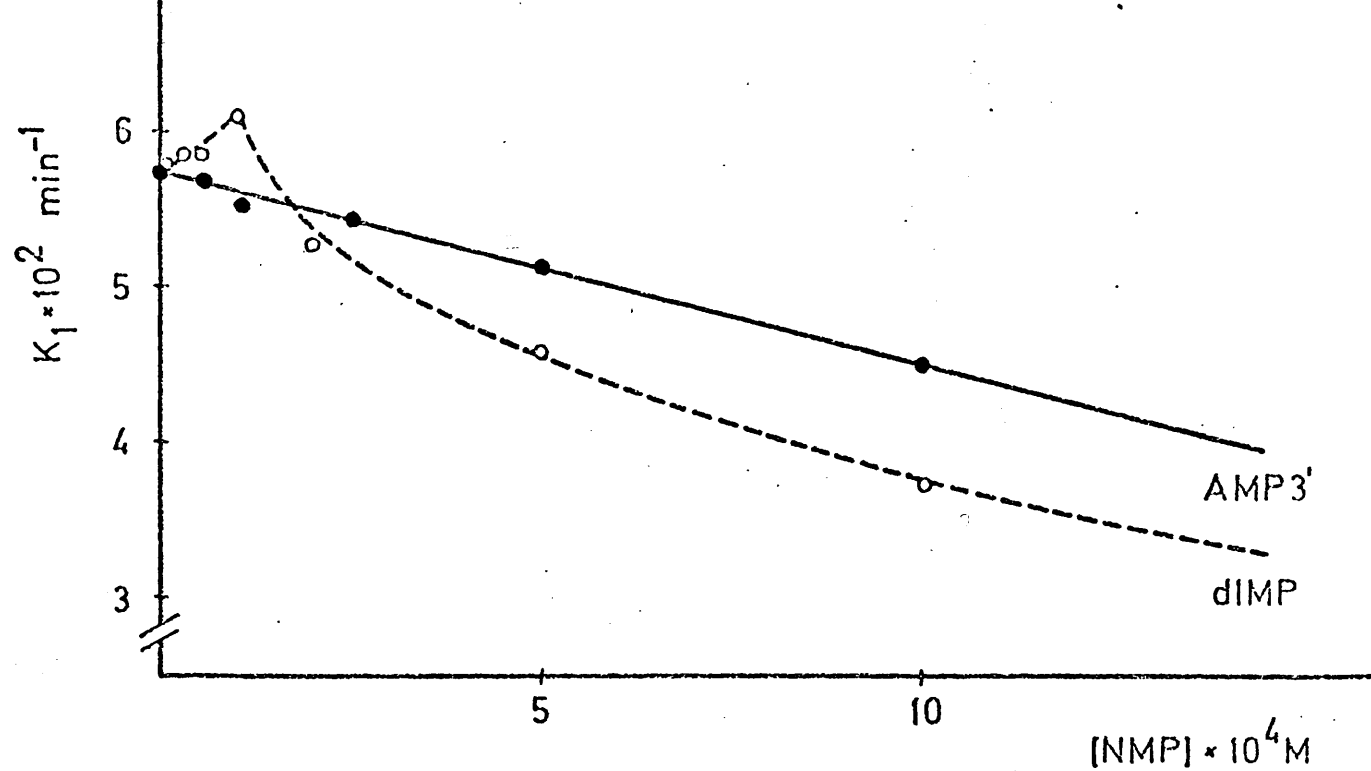


Fig. 55.- Dependencia de las constantes de velocidad K_1 y K_2 de valoración de SH en función de la concentración de nucleótido.

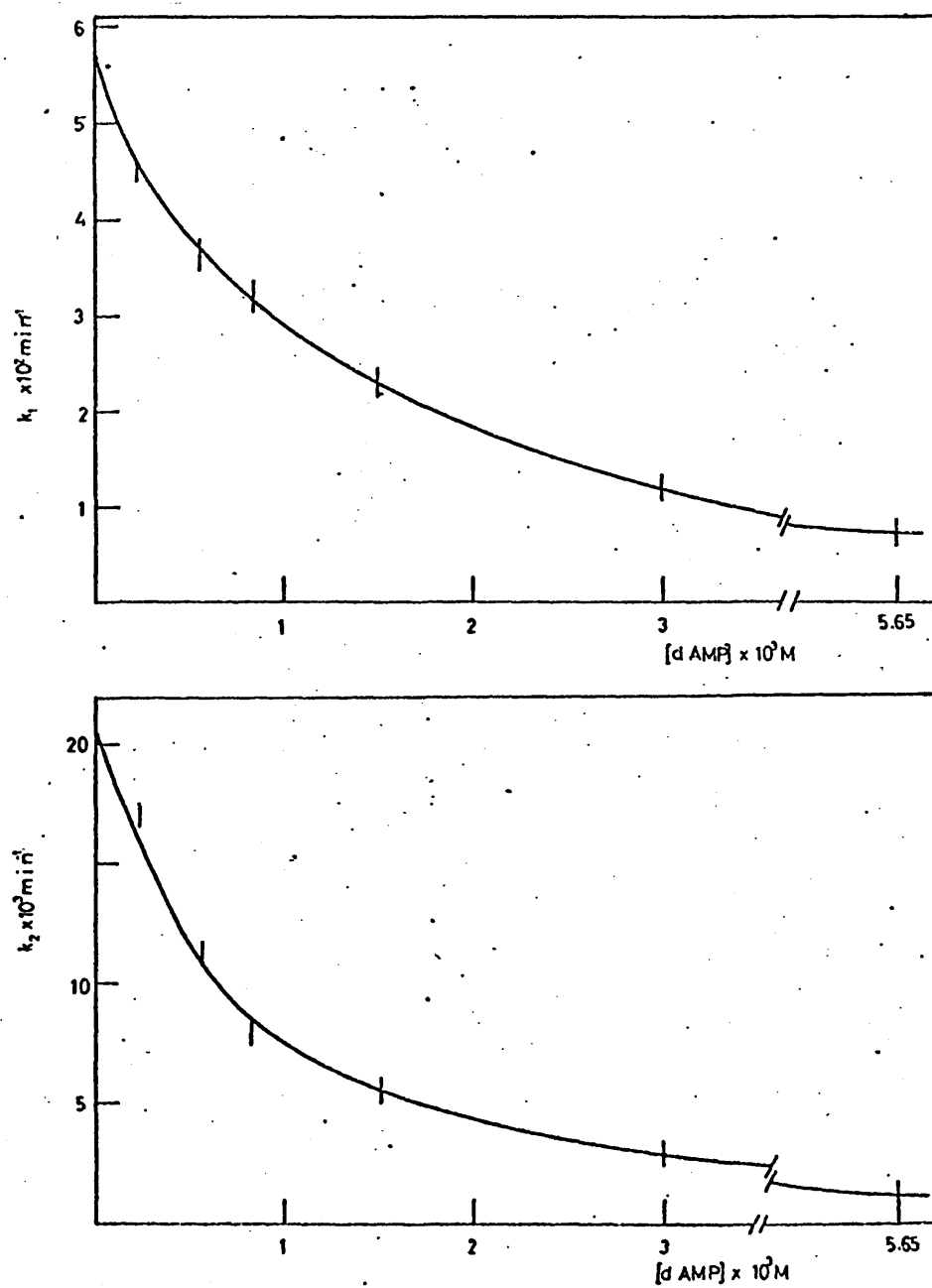


Fig.56. - Dependencia de las constantes de velocidad K_1 y K_2 de valoración de SH en función de la concentración de nucleótido.

TABLA XVI

Resumen resultados de la protección de -SH lentos contra DTNB (25°C)

Nucleótido	$K_{1/2}(\text{SH}_1)$	(% protección máxima)	$K_{1/2}(\text{SH}_2)$	(% protección máxima)
AMP	$(7,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	75	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	75
IMP	$(6,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	52	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	50
2' dAMP	$(8,4 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	87	$(5,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	92
2' dIMP	$(7,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	35	$(2,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	50
AMP 2'	$(6,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	58	$(9,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	65
AMP 3'	$(7,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	52	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	50

Discusión:

Todos los análogos de AMP con modificación-química en el anillo de adenina protegen ambos -SH lentos exhibiendo características de cooperatividad positiva en función de la concentración de nucleótido, a excepción de IMP, puesto que el grupo -SH₂ no se protege de modo cooperativo, aunque el proceso de activación presente características sigmoideas, lo que concuerda con que la valoración entálpica de la fosforilasa b con IMP, directamente ligada a alteraciones conformacionales (al igual que la protección de los -SH lentos), no presente tampoco características sigmoideas (fig. 38). Es preciso señalar que el diferente mecanismo de protección de los -SH lentos en AMP e IMP debe provenir de una diferente acción estructural sobre la enzima, como comentamos en el apartado anterior; en ambos casos, sin embargo, la separación entre acción conformacional y catalítica del nucleótido quedaba netamente establecida.

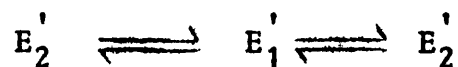
La separación entre estas dos facetas de la acción de los nucleótidos sobre la fosforilasa b resulta evidente en los análogos de AMP estudiados en este apartado. Así, en tanto que 2' dAMP y 2' dIMP protegen de manera no cooperativa el grupo -SH₂, los inhibidores AMP-2' y AMP-3' lo hacen cooperativamente, al igual que

AMP. Es decir, o bien la adenosina es fundamental para el carácter cooperativo asociado a las transiciones conformacionales que protegen los -SH lentos o bien lo es el nucleótido en conformación syn. Como se verá a continuación, esta última hipótesis parece ser la más probable.

Los resultados expuestos en la tabla XVI -- muestran que la $K_{1/2}(\text{SH}_2)$ se ve fuertemente afectada - en dos casos: 2' -dAMP y AMP-2', permaneciendo prácticamente constante en los demás casos. En los dos nucleótidos citados la posición alterada, respecto de AMP, es el C(2') de la ribosa y, por tanto, el equilibrio transconformacional $\text{syn} \rightleftharpoons \text{anti}$ si bien en distinta extensión. En el caso del 2' dIMP el valor de $K_{1/2}(\text{SH}_2)$ no se ve afectado, y sirve para confirmar que IMP adopta un posicionamiento muy diferente al de AMP en el complejo que forman nucleótido -enzima.

El valor de $K_{1/2}(\text{SH}_1)$ se ve muy debilmente alterado en los nucleótidos "derivados" de AMP por modificación química en la ribosa o en la posición del - grupo fosfato, mientras que las modificaciones químicas en la base lo afectan fuertemente. Este hecho experimental es paralelo a las grandes alteraciones en las entalpías de interacción de análogos de AMP en la base-fosforilasa b, correspondiente a la primer meseta de las curvas calorimétricas, lo que explica la relación

lineal entre $K_{1/2}(\text{SH}_1)$ y la $K_{1/2}$ del efecto entálpico asociado a la primera región de las curvas microcalorimétricas (fig. 45) y demuestra que este $-\text{SH}_1$ se protege en la transición conformacional producida por la unión del nucleótido a la primera clase de sitios (de mayor afinidad). Esta hipótesis permite explicar también el diferente grado de protección de este $-\text{SH}_1$ por los diferentes análogos estudiados, ya que estas diferencias pueden ser entendidas como alteraciones en el estado E_1' , al que se llegaría en algunos casos, y en otros a valoraciones en el estado E_2' - no cooperativas-. Recordemos que a concentraciones de enzima $< 1.5 \text{ mg/ml}$ el análisis de la curva de AMP (fig. 18) conducía a la existencia de tres estados conformacionales enzimáticos en equilibrio.



Por tanto, el grupo $-\text{SH}_1$ se protege en la transición conformacional alostérica $E_2' \rightleftharpoons E_1'$. El grupo $-\text{SH}_2$ se protege cooperativamente aún a concentraciones menores de nucleótido (para los análogos de este apartado) y se valora por DTNB a menor velocidad. Por consiguiente, la transición conformacional que protege este grupo $-\text{SH}_2$ ha de ser anterior a la transición que provoca la protección del $-\text{SH}_1$, $E_2' \rightleftharpoons E_1'$, la cual reforzaría simultáneamente la protección del $-\text{SH}_2$. El transito conformacional citado ha de ser entálpicamente muy

bajo (casi despreciable) ya que no se detecta en los estudios microcalorimétricos. Una posible explicación para tal transición es la siguiente: una transición desde un estado: enzima-nucleótido (anti) a otro: enzima-nucleótido (syn), transición que reúne las dos condiciones previamente analizadas: (a) se ve muy afectada por la sustitución del -OH en C(2') y (b) desde un punto de vista entálpico es casi despreciable; para AMP, por ejemplo, $\Delta H_{\text{syn} \rightleftharpoons \text{anti}} = - (8.0 \pm 0.8) \text{ kJ/mol monómero (125)}$, frente a $- (77 \pm 2) \text{ kJ/mol monómetro}$, que es el valor de la primera meseta de la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP.

Los resultados cinéticos muestran un comportamiento singular en el proceso de activación por 2'-dAMP y 2'-dIMP e inhibición por AMP-2' y AMP-3' -- respecto de la concentración de fosfato. Para AMP-2' y AMP-3' este comportamiento puede correlacionarse con la duplicidad de efectos observada en la protección del -SH₁ por ambos nucleótidos por valoración con -- DTNB. Los dos nucleótidos son inhibidores, pero --- AMP-3' produce a bajas concentraciones, hasta $(1-2) \times 10^{-4} \text{ M}$ a 25°C, una débil activación de la fosforilasa b que desaparece al elevar la concentración de nucleótido por encima de este valor. El efecto de -- inhibición comienza a ser dominante a la misma concentración de AMP-3' en que el grupo -SH₂ comienza

a protegerse contra DTNB y cuando la desprotección del grupo $-SH_1$ alcanza su valor máximo. AMP-2' presenta, --asimismo, un efecto de desprotección del grupo $-SH_1$ --que no se correlaciona a $25^\circ C$ con un efecto doble en el proceso cinético, no obstante esta duplicidad de efectos aparece a más baja temperatura ($16^\circ C$). Por otra parte, recientes cálculos teóricos con la molécula de AMP-3' indican que la conformación syn se ve más favorecida en este nucleótido que en AMP (119). Puede darse una posible explicación si consideramos que el pequeño efecto activador de AMP-3' (del orden del producido por 2' -IMP) es debido a la unión del nucleótido a la enzima en conformación anti y que por la posición aberrante del grupo fosfato permitiría un bajo nivel de activación. El efecto inhibitor puede ser atribuido al cambio conformacional local que produce el nucleótido al pasar a su conformación syn (coincide con el comienzo de la protección del $-SH_2$), probablemente por interacción directa del grupo fosfato del nucleótido con el sitio de unión del sustrato. Esta hipótesis se ve apoyada por la proximidad espacial evidente entre los sitios de unión del fosfato y de AMP --véase la discusión de los resultados del apartado --anterior, concordando además con la conclusión alcanzada en el apartado (IV-I) de que en la segunda --clase de sitios de unión el grupo fosfato desempeña un papel director, siendo estos sitios de unión los

implicados en la activación enzimática (capítulo V). La ausencia del débil efecto activador de AMP-2' a 25°C pese al análogo comportamiento de los -SH lentos, se puede explicar considerando que las distancias entre los grupos implicados en el centro catalítico ha de estar aún más afectada por la diferente posición del fosfato. El efecto de inhibición -- puede ser considerado en principio del mismo modo -- que en AMP-3'. La transición conformacional a -- (16-18)°C, al alterar las distancias permite que el débil efecto de activación se haga evidente.

El efecto del fosfato sobre 2' -dAMP y 2' -dIMP puede entenderse de modo similar, considerando que al elevar la concentración de sustrato -- hasta $9.6 \times 10^{-3}M$ la afinidad de 2' -dIMP, y desde esta concentración de fosfato para 2' -dAMP, se ve reforzada por interacciones heterotrópicas. No obstante, a concentraciones muy elevadas de fosfato -- se produciría un efecto de desplazamiento de los -- activadores de sus sitios de unión, mucho más fuerte que para los activadores fuertes puesto que la afinidad de éstos hacia los sitios de unión es mucho mayor. La disminución de la actividad catalítica máxima producida por 2' -dAMP y 2' dIMP, dependiente de la concentración de fosfato, confirma esta hipótesis, así como que coincide el comienzo de la segunda región de las cinéticas de acti-

vación de 2' -dAMP extrapolada a muy baja concentración de fosfato, con el comienzo de la segunda región de la curva microcalorimétrica de 2' -dAMP (véase más adelante) que presenta un alto efecto calorífico (quizá debido a la interacción inespecífica del grupo fosfato - véase el apartado(IV-2)). Los pequeños niveles de activación que estos nucleótidos producen en la fosforilasa b pueden justificarse por un incorrecto posicionamiento del nucleótido en el complejo nucleótido enzima, posiblemente debido a la no formación de la conformación syn. La disminución del nivel máximo de activación al disminuir la afinidad de los sitios hacia el nucleótido (hasta $9,6 \times 10^{-3}M$ de fosfato) es entonces comprensible. La elevación de la actividad máxima a concentraciones superiores de fosfato puede entenderse si se considera que el sustrato pasaría a ser el principal efector conformacional a estas concentraciones (superiores a la concentración de fosfato precisa para producir un 50 % de saturación de la curva de valoración entálpica de la fosforilasa b por fosfato, fig. 10).

La duplicidad de comportamiento de los deoxiderivados y de AMP2' y AMP3' en función de la concentración de fosfato no puede ser explicado haciendo uso solamente de premisas alostéricas, ya que exige, la consideración de efectos estéricos -

asociados a la unión de ligados bifuncionales que pueden competir con el sustrato, fosfato, que conducen también a cinéticas de tipo sigmoideo (126).

Los valores de ΔH dados en la tabla XV muestran que los inhibidores estudiados e IMP poseen una entalpia aparente del complejo nucleótido-enzima superior por debajo de la temperatura de transición conformacional enzimática, (16-18)°C, al contrario que AMP y los análogos de AMP que actúan como activadores. El caso de 2' dAMP es singular por cuanto que no detecta la transición conformacional térmica en su unión a la enzima, o bien lo hace muy levemente. Exceptuando 2' -dIMP todos los demás derivados de AMP por modificación en el C(2'), AMP-2' y 2' -dAMP, presentan una energía de activación muy similar a temperaturas superiores a (16-18)°C. Por otra parte el nucleótido que presenta una energía de activación más baja es AMP-3', que es a su vez el nucleótido que presenta una mayor población en conformación syn. Estos datos apoyan la aportación de la transición (anti \rightleftharpoons syn) al proceso de formación del complejo nucleótido-enzima catalíticamente activo.

Al comparar las constantes cinéticas K_a o K_i relativas (véase la tabla XVII) de los nucleótidos estudiados a 4°C y 25 °C se observa que el estado conformacional estabilizado a baja temperatura (< 16°C)

TABLA XVII

Datos cinéticos

Nucleótido	4°C $K_{1/2}$ relativa	25°C $K_{1/2}$ relativa (a)	25°C $K_{1/2}$ relativa (b)
AMP	1	1	1
IMP	24	13	24
dAMP	17	6	43
dIMP	36	9,5	--
AMP 2'	34	18	62
AMP 3'	37	24	63

Todas las constantes se han referido a la de AMP que se ha tomado como unidad.

(a) En tampón glicilglicina.

(b) En tampón glicerofosfato, tomados de la referencia 113.

presenta una mayor selectividad estructural hacia las tres partes de la molécula de AMP.

La valoración de las cisteínas lentas por DTNB se ven también afectadas por la temperatura. El grado de protección de 2' -dAMP e IMP a 4°C (69) y a 25 °C no sufre una alteración apreciable. No ocurre lo mismo con el mecanismo del proceso de protección de los -SH lentos, que difiere en la protección del SH₁ por IMP ya que ésta es hiperbólica a 4°C. Las constantes de semiprotección se ven alteradas, como es lógico, puesto que varían las constantes de disociación de los nucleótidos con la temperatura. No obstante, una correlación más íntima de los resultados obtenidos a 25°C y 4°C no puede ser realizada puesto que la posibilidad de la alteración en el orden de valoración de las cisteínas no es descartable.

Finalmente, hay que señalar que según puede apreciarse en la tabla XVII el glicerofosfato (que conduce a un estado conformacional dimérico muy similar al inducido por el fosfato, E₃, en la fosforilasa b) incrementa la sensibilidad de la enzima hacia las modificaciones realizadas en la molécula de AMP, actuando en este sentido, aún más energicamente que la temperatura.

II. Resultados microcalorimétricos.

En la figura 57 se dan los resultados ob

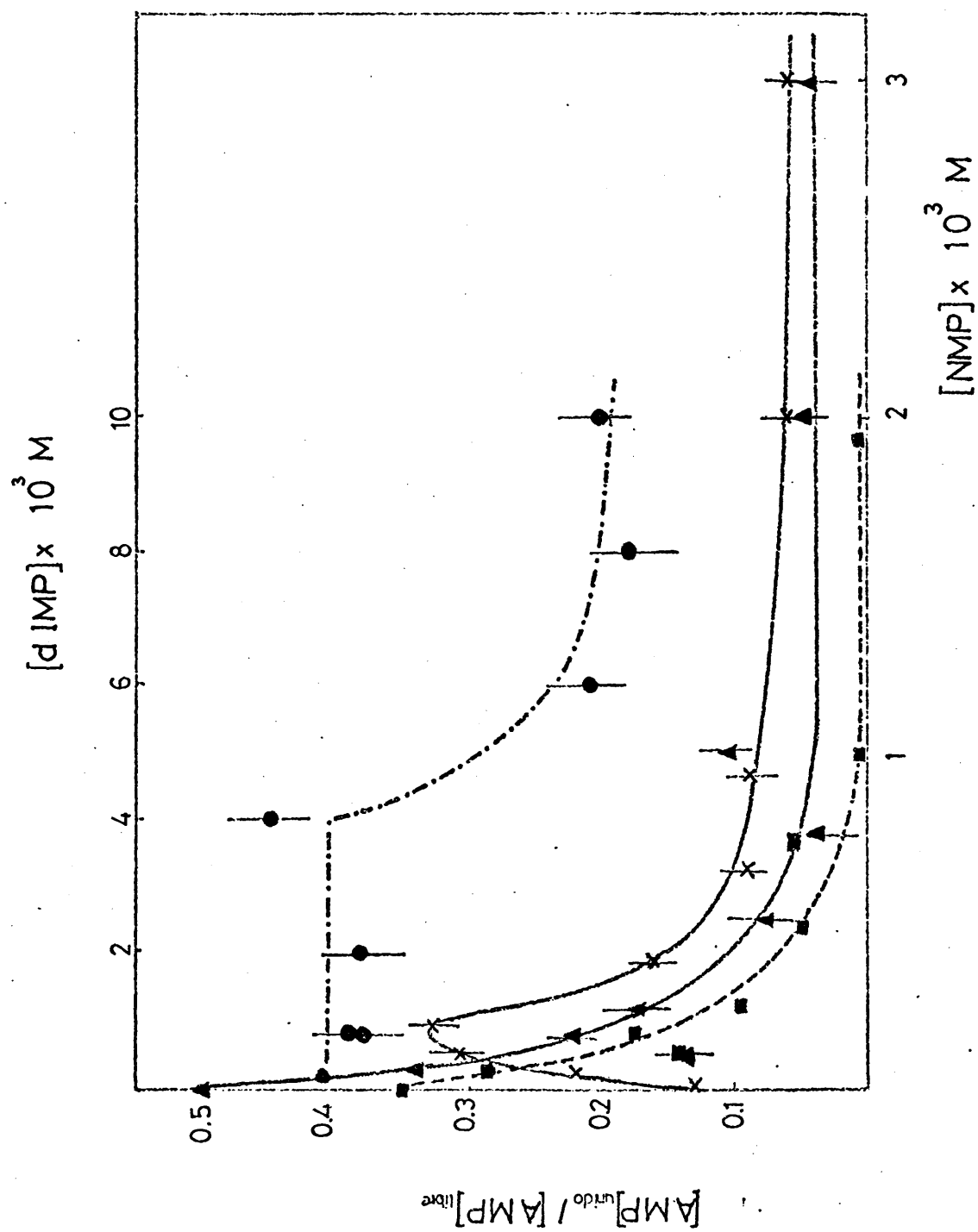


Fig.57.- Desplazamiento de AMP C^{14} unido a la enzima por diversas concentraciones de nucleotidos: ● dIMP, X dAMP, ▲ AMP 2', ■ AMP 3'.

TABLA XVIII

Valores de las constantes de semidesplazamiento de AMP-C¹⁴ por los nucleotidos
estudiados y de mitad de activación o inhibición, a 25°C

Nucleotido	$k_{1/2}$ caza	$k_{1/2}$ relativa (activ. ó inhib.)
AMP	$1,2 \times 10^{-4}$	1
AMP 2'	$1,25 \times 10^{-4}$	34
AMP 3'	$1,55 \times 10^{-4}$	37
2'dAMP	4×10^{-4}	17
2'dIMP	$(10 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	36

tenidos para el desplazamiento de AMP-C¹⁴ por AMP-2', AMP-3', 2'-dAMP y 2'-dIMP. Puede observarse que 2'-dIMP no desplaza a AMP-C¹⁴ a 25°C de sus sitios de unión hasta concentraciones de 2'-dIMP superiores a 4×10^{-3} M, AMP-2' y AMP-3' desplazan completamente a 25°C a AMP-C¹⁴ y 2'-dAMP desplaza aproximadamente un 50% de AMP-C¹⁴, en perfecto acuerdo con los resultados obtenidos por Buc y col. a 4°C (11).

En la tabla XVIII se dan las constantes de semidesplazamiento, $K_{1/2}$ para los nucleótidos citados en el párrafo anterior.

En las figuras 58 a 61 se muestran los resultados obtenidos en la valoración entálpica de la fosforilasa b por los nucleótidos mencionados previamente. La tabla XIX resume los valores de la entalpía total de interacción de los distintos nucleótidos con las dos clases de sitios que distinguen en la fosforilasa b -- ΔH_I° y ΔH_{II}° . Todos ellos, excepto 2'-dIMP, presentan dos regiones netamente diferenciadas, en analogía con AMP (fig. 7), lo que implica la existencia de dos clases de sitios de diferente afinidad hacia el mismo. La saturación entálpica de cada clase de sitios presenta un hábito sigmoideo, muy débil en la segunda región de la curva de 2' dAMP (aunque existe, como lo demuestra el que la representación de inversos no sea lineal), lo que revela la existencia de cooperatividad homotró

TABLA XIX

Valores de las entalpías de saturación de las dos clases de sitios de los nucleótidos estudiados, a 25°C

Nucleótido	$-\Delta H_I$ (kJ/mol monómero)	$-\Delta H_{II}$ (kJ/mol monómero) (a)
AMP	77 ± 2	284 ± 20
AMP 2'	65 ± 2	235 ± 12
AMP 3'	118 ± 8	292 ± 20
2' dAMP	230 ± 10	670 ± 25
2' dIMP	1.250 ± 50	

(a) $\Delta H_{II} = \Delta H_T - \Delta H_I$

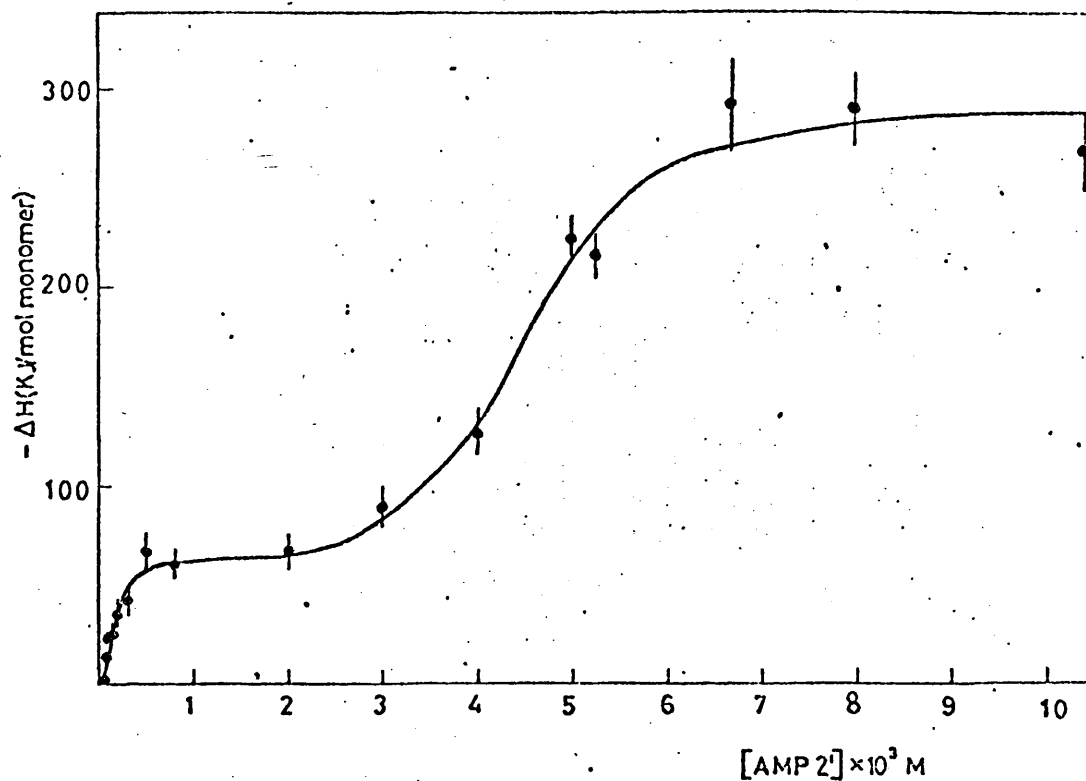


Fig.58.- Valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP 2', a 25°C. [Ph b] = 2,66 mg/ml.

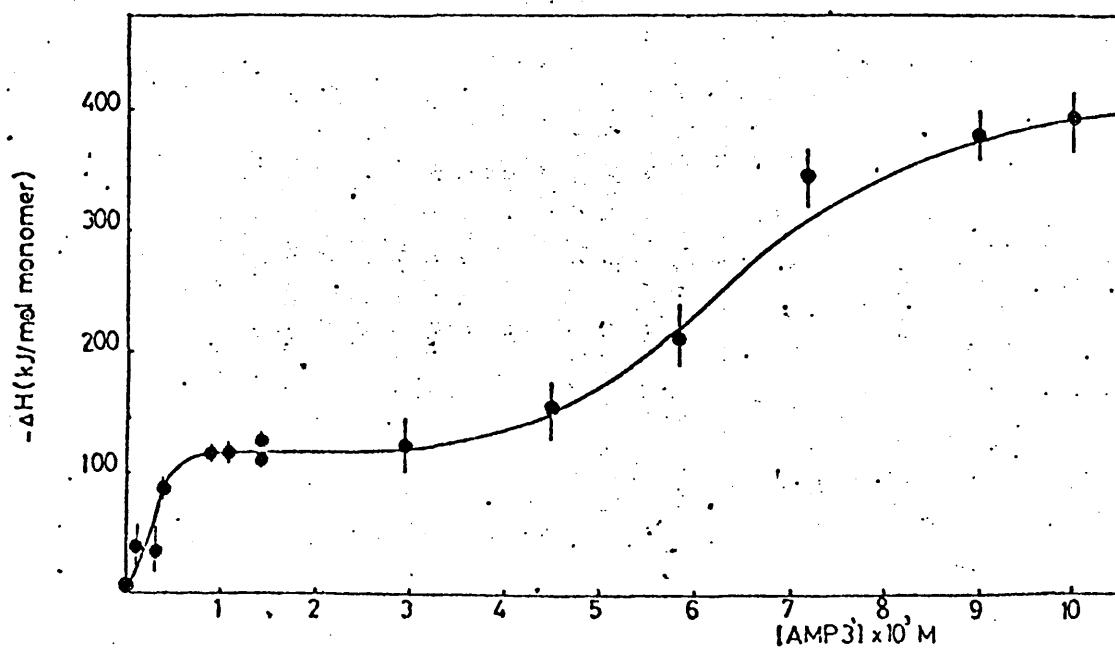


Fig.59.- Valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP 3', a 25°C [Ph b] = 2,66 mg/ml.

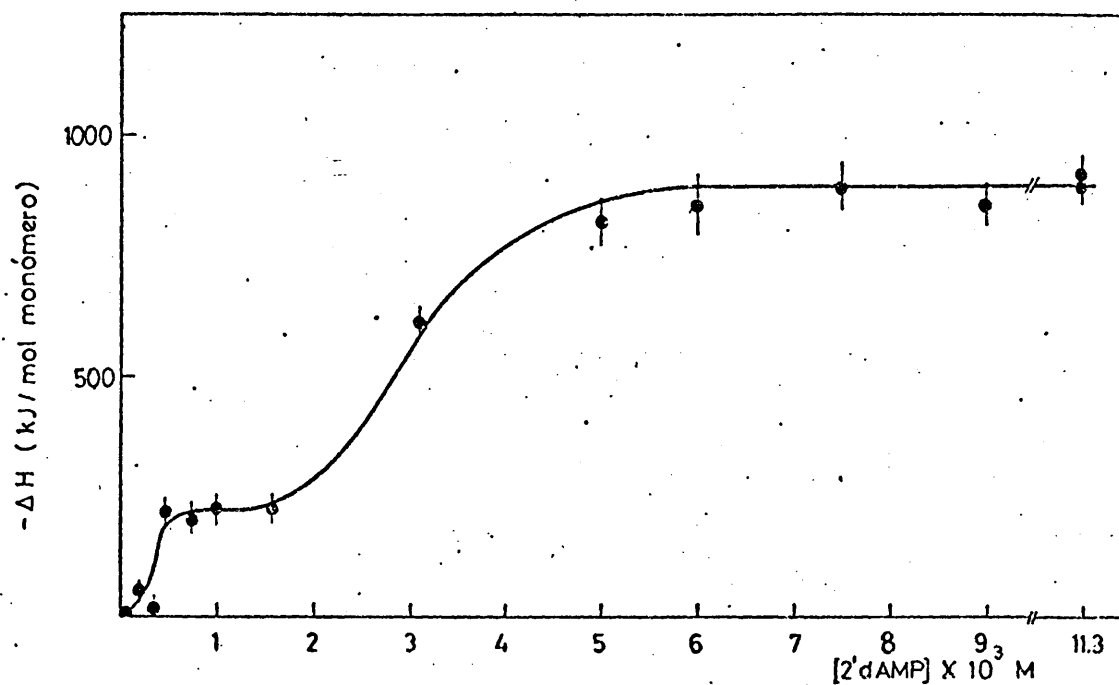


Fig. 60. - Valoración entálpica de la fosforilasa b por 2'dAMP, a 25°C. [Ph b] = 2,66 mg/ml.

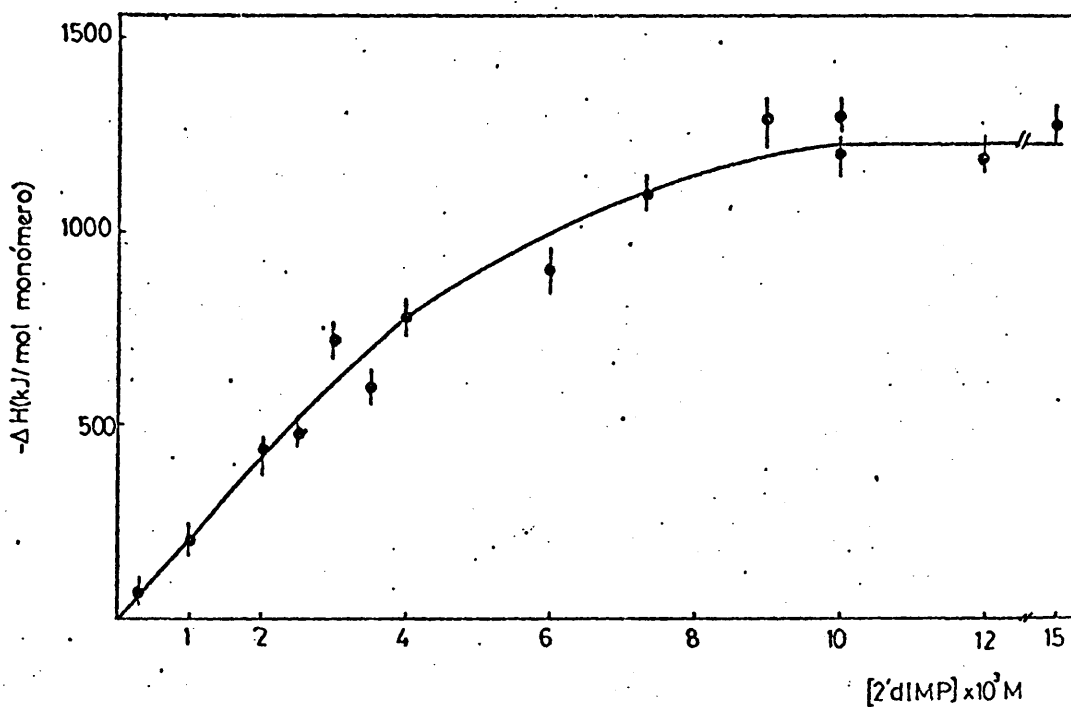


Fig. 61. - Valoración entálpica de la fosforilasa b por 2'dIMP, a 25°C. [Ph b] = 2,66 mg/ml.

pica positiva en los procesos de saturación de ambas clases de sitios. Cómo se demostró en el apartado -- IV-4, estas curvas requieren para su explicación la existencia de un mínimo de tres estados conformacionales enzimáticos en equilibrio, siendo regido el -- equilibrio entre cada dos estados por el modelo -- "pseudoconservativo" generalizado, o simplemente por el modelo concertado. 2' dIMP presenta un proceso de saturación entálpica de carácter hiperbólico, al -- igual que IMP del que deriva. La representación de inversos de los datos dados en la fig. 61, no mostra da, se ajusta a una línea recta. A partir de esta -- representación de inversos se ha calculado el valor de K_m del sistema.

Los elevados valores entálpicos obtenidos en las condiciones de saturación de la segunda re-- gión en todos los casos, y en la primera meseta de las curvas de 2' -dAMP hace pensar en una posible implicación de cambios en el estado de agregación de la fosforilasa b. No obstante, ninguno de los -- cuatro nucleótidos estudiados en este subapartado produce agregados de la fosforilasa b estables a la ultracentrifugación (condiciones experimentales indicadas en métodos). Así, AMP-2' y AMP-3' llevan, - en las condiciones de la primera meseta de la curva calorimétrica, a un estado dimérico enzimático cuyo

coeficiente de sedimentación es (8.3-8.4)S, siendo despreciable la presencia de tetrámero. (<5%). En las condiciones experimentales de la segunda meseta de las curvas de valoración entálpica, la fosforilasa b migra en un solo pico, simétrico, que posee un coeficiente de sedimentación igual a 9.1 S, que debe corresponder a un dímero modificado. Este estado enzimático ha de ser muy similar al E_3^1 , al que llevan a la enzima AMP ($10^{-2}M$) e IMP ($10^{-2}M$) a una concentración de enzima menor de 1.5 mg/ml. Los deoxiderivados llevan a la enzima hacia un estado que migra con 8.6 S de coeficiente de sedimentación (dímero), siendo menor de un 10% el porcentaje de tetrámeros detectable. No obstante, 2'dAMP produce agregados de elevado peso molecular que se destruyen por la fuerza centrífuga, según se observa por el visor de la ultracentrífuga. Así pues, en este caso el calor observado experimentalmente en la interacción 2'-dAMP fosforilasa b puede ser justificado, en gran parte, por la formación de agregados de elevado peso molecular. En los demás casos la explicación ha de ser muy diferente.

Exceptuando el caso de 2' dIMP, el tratamiento teórico de todas las curvas de valoración entálpica, para la obtención de las constantes de disociación de los complejos nucleótido-enzima y de equilibrio transconformacional, se ha hecho siguiendo el modelo descrito en el apartado IV-4.

La primera región de tales curvas (fig. 58 a 60) se describe de modo idéntico a la primera región de la curva de valoración por AMP (fig. 7). La ecuación -- que rige la variación de entalpía para la saturación de la primera clase de sitios de unión es, pues, la ecuación (4-VIII):

$$\frac{{}^{(1)} \Delta H_T}{{}^{(1)} \Delta H_p} = \frac{\alpha (\alpha + 2)}{{}^{(1)} L_o + (1 + \alpha)^2}$$

donde el significado de los distintos símbolos utilizados se explicó en el apartado (IV-4).

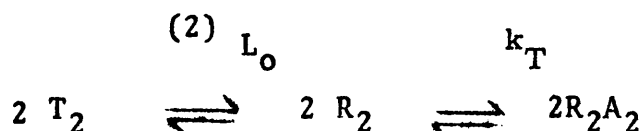
Por aplicación de la anterior ecuación, variando ${}^{(1)} L_o$ y ${}^{(1)} k_R$, se han obtenido los pares de valores de estos parámetros que mejor se ajustan a los datos experimentales y que, al mismo tiempo, sean más próximos a los datos cinéticos obtenidos con AMP y 2'-dAMP. Estos valores se dan en la tabla XX. Puede observarse que los valores de ${}^{(1)} L_o$ y ${}^{(1)} K_r$ obtenidos para 2'-dAMP concuerdan con los obtenidos a partir de las medidas cinéticas (véanse los resultados cinéticos), para la primera región del proceso de activación. Por tanto, probablemente sea el primer estado conformacional enzimático al que conduce 2'-dAMP el responsable de la activación que este nucleótido produce (4% de la activación máxima alcanzada a saturación de AMP).

TABLA XX

Constantes de los complejos nucleótido-fosforilasa b a 25° C

Nucleótido	(i) L_o	(i) K_R	(2) L_o	(2) K_R
AMP	700	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	60.000	$1,9 \times 10^{-4}$
2' AMP	500	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	35.000	9×10^{-4}
3' AMP	750	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	220.000	$8,9 \times 10^{-4}$
2' dAMP	400	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	10.000	9×10^{-4}
2' dIMP		$(K_m) = 5,6 \times 10^{-3}$		

La segunda región de las curvas de 2'dAMP, AMP-2' y AMP-3' se describen por el mismo esquema formal que la primera región de las curvas de N₆-metil-AMP y 1-N-metil AMP. Este es el siguiente:



donde A es el símbolo del nucleótido. El tratamiento es similar al realizado para la primera región de la curva de valoración entálpica: equilibrio transconformacional regido por el modelo concertado, unión exclusiva al estado R₂ y alta cooperatividad homotrópica entre cuatro centros. Esta última exigencia matemática para una descripción aceptable de la saturación de la segunda clase de sitios implica una alta interacción interdímeros en solución, ya que hay dos sitios de débil afinidad por dímero, como ocurría con AMP (véanse las discusiones de los apartados IV-4 y VI-A), aunque en este caso no se produzcan "Tetrámeros resistentes a las drásticas condiciones de ultracentrifugación". Por esta razón se han duplicado todas las especies del esquema cinético anterior.

Los símbolos ⁽²⁾L_o y k_R son, respectivamente, la constante de equilibrio transconformacional

en ausencia de ligando, $(2) L_o = \frac{(T_2)}{(R_2)} k_R^o$, y la constante de disociación global $k_T = (2) k_R^o$, siendo $(2) k_R$

la constante de disociación intrínseca del nucleótido en el estado R_2 . Para conseguir un buen ajuste de los puntos experimentales es preciso que $(2) L = (2) L_o / (1 + \alpha)^2$, donde $\alpha = (A) / (2) k_R$ es la concentración de ligando reducida a esta constante de disociación intrínseca. Esta necesidad formal demuestra que, en la producción de calor, la contribución debida a la unión directa del nucleótido a la enzima es importante, a diferencia de lo que ocurre con el primer tipo de sitios. Si consideramos los resultados de protección de -SH lentos contra DTNB y los resultados del apartado anterior, donde se concluyó que el efecto calorífico más importante en esta segunda transición ha de provenir de la formación de puentes disulfuro, puede sugerirse que, en este caso, la formación de estos puentes disulfuro requerirán la acción directa del nucleótido sobre los -SH de cada subunidad, lo cual se ve corroborado por la pérdida de cooperatividad del -SH₁ lento para 2'dAMP, AMP-2' y AMP-3' en el proceso de protección por estos nucleótidos contra DTNB. La ecuación que rige el balance entálpico del anterior proceso se deduce fácilmente:

$$\frac{{}^{(2)}\Delta H_T}{{}^{(2)}\Delta H_p} \approx \frac{[\alpha^4 + 4\alpha^3] (1+\alpha)^2}{{}^{(2)}L_0 + (1+\alpha)^4 (1+\alpha)^2} \quad \text{(VI-9)}$$

donde ΔH_p^{II} es la entalpía de saturación del efecto entálpico asociado al segundo sitio: $\Delta H_p^{II} = \Delta H_{\max} - \Delta H_p^I$.

. Aplicando la ecuación anterior se han obtenido los valores de ${}^{(2)}L_0$ y ${}^{(2)}k_R$ dados en la tabla XX para AMP-2' y AMP-3'.

En la tabla XX se han resumido los valores de las propiedades termodinámicas de la formación de los complejos nucleótido-enzima. Puede observarse que los valores de ΔG° son muy similares en todos los casos, siendo 2'dIMP el que presenta un valor más bajo.

El efecto de la variación de la concentración de la enzima sobre la entalpía de interacción de los nucleótidos estudiados se muestra en las figs. 62 a 69. Puede apreciarse en ellas que sólo AMP-2', a saturación total del efecto entálpico, muestra un comportamiento similar al de los nucleótidos activadores fuertes análogos de AMP. A 1.0 mg/ml de enzima y concentración saturante de AMP2' no se detectó la presencia de tetrámeros por ultracentrifugación. La entalpía aparente de la transición es (295 ± 30) kJ (mol monómero) $^{-1}$, muy próxima a la entalpía de ruptura de un puente disulfuro (284 ± 4) kJ (mol monómero) $^{-1}$ (112).

Las figuras 63 y 64 muestran los resultados experimentales obtenidos, al variar la concentración de enzima, para la entalpía de interacción de AMP-3' con la fosforilasa b en función de la concentración de enzima. En la obtención de los datos representados en dichas figuras se mantuvo constante la concentración de AMP-3' variando, por tanto, la relación $\frac{(AMP-3')}{(enzima)}$ al variar la concentración enzimática. Ex-

perimentos de ultracentrifugación a 1.0 y 4.0 mg/ml no detectan la presencia de tetrámero o agregados superiores de la fosforilasa b. En estas figuras es de esperar, por consiguiente un balance neto de dos variables simultáneas: concentración de enzima y relación $\frac{(AMP-3')}{(enzima)}$. La curva de la fig. 63 presenta

el mismo hábito que la obtenida, en idéntico estudio, para IMP y que las obtenidas al variar la temperatura (apartado IV-4). En la fig. 65 se dan los resultados experimentales obtenidos a concentraciones constantes de enzima de 1.0 y 3.0 mg/ml en función de la concentración de AMP-3'. La representación de la entalpía de interacción AMP-3'-fosforilasa b se ha realizado en función de la relación $\frac{(AMP-3')}{(enzima)}$, obser-

vándose de nuevo que la saturación de las distintas clases de sitios de unión tiene lugar en el mismo intervalo de valores de la relación $\frac{\text{moléculas AMP-3'}}{\text{moléculas enzima}}$,

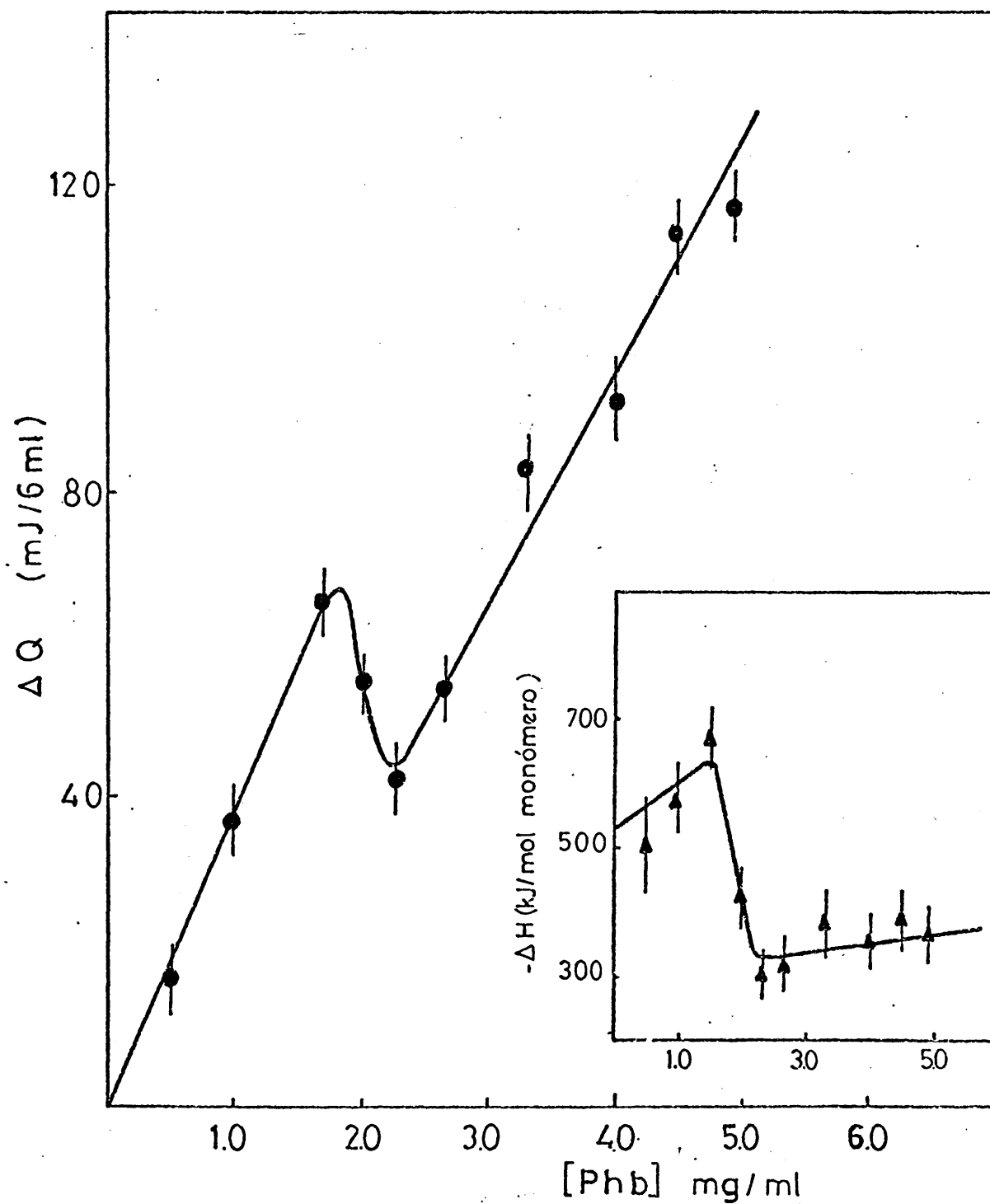


Fig. 62. - Interacción calorimétrica fosforilasa b con AMP 2' ($7,5 \times 10^{-3} M$) en función de la concentración de fosforilasa b a $25^{\circ}C$. Recuadro: Entalpia de interacción de los resultados anteriores.

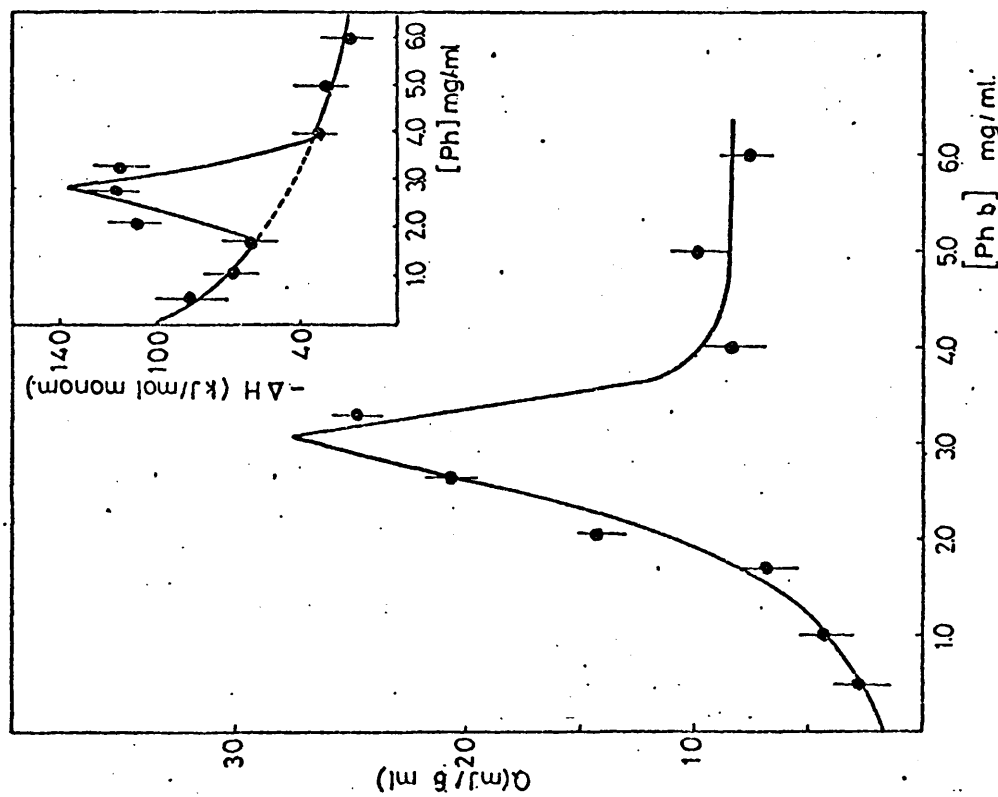


Fig. 63. - Interacción fosforilasa b-AMP 3' (2 mM) en función de la concentración de enzima. Recuadro: Entalpías de interacción.

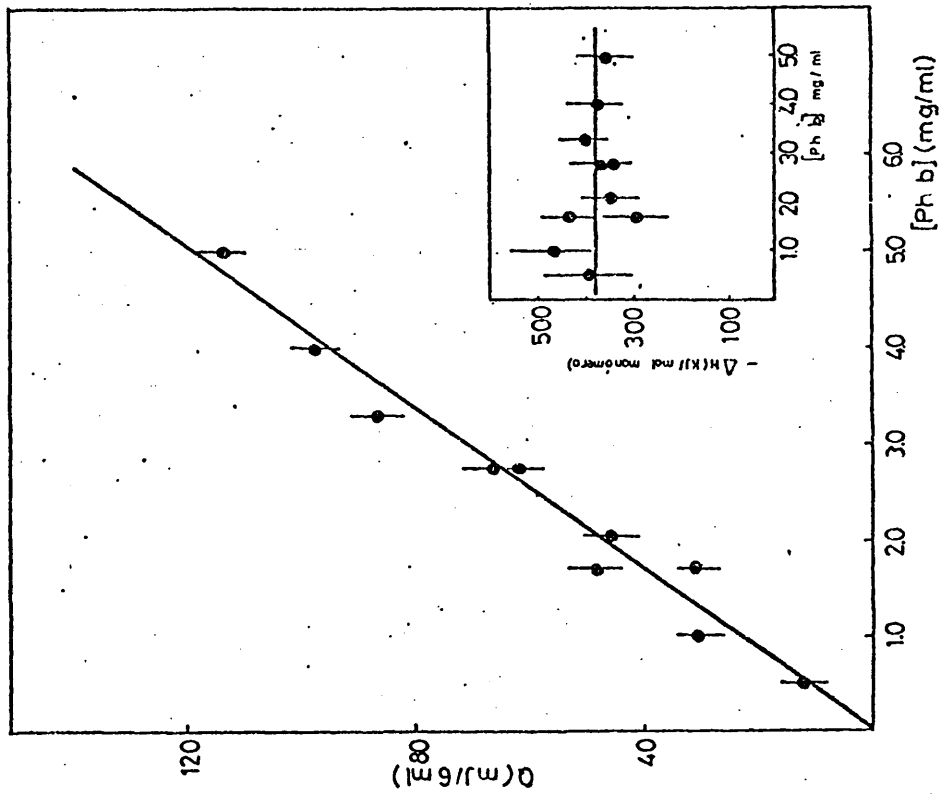


Fig. 64. - Interacción fosforilasa b-AMP 3' (10 mM) en función de la concentración de enzima. Recuadro: Entalpías de interacción.

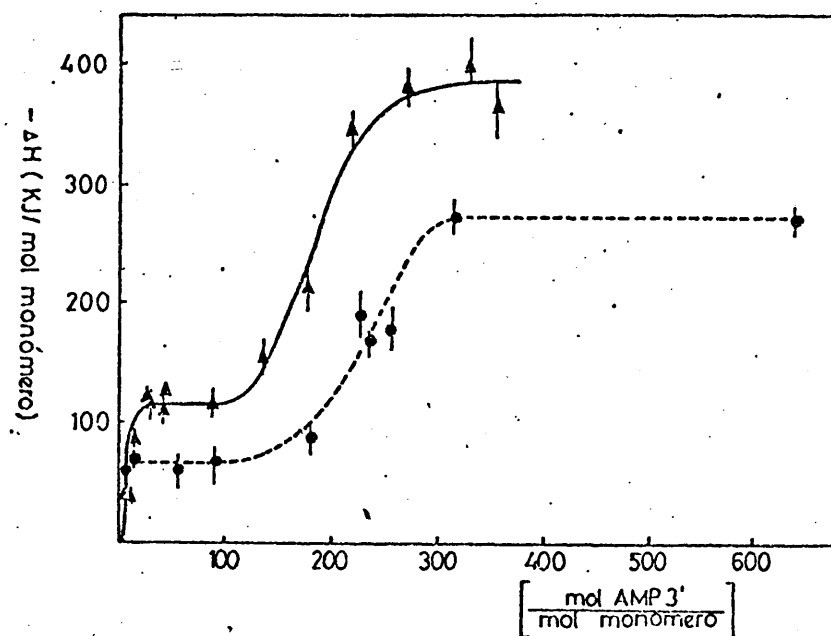


Fig. 65. - Valoración entálpica de la fosforilasa b por AMP 3' en función de la relación $[AMP\ 3']/[Ph\ b]$.
 $[Ph\ b] = 1\text{ mg/ml}$ ----- $[Ph\ b] = 2,66\text{ mg/ml}$ ———

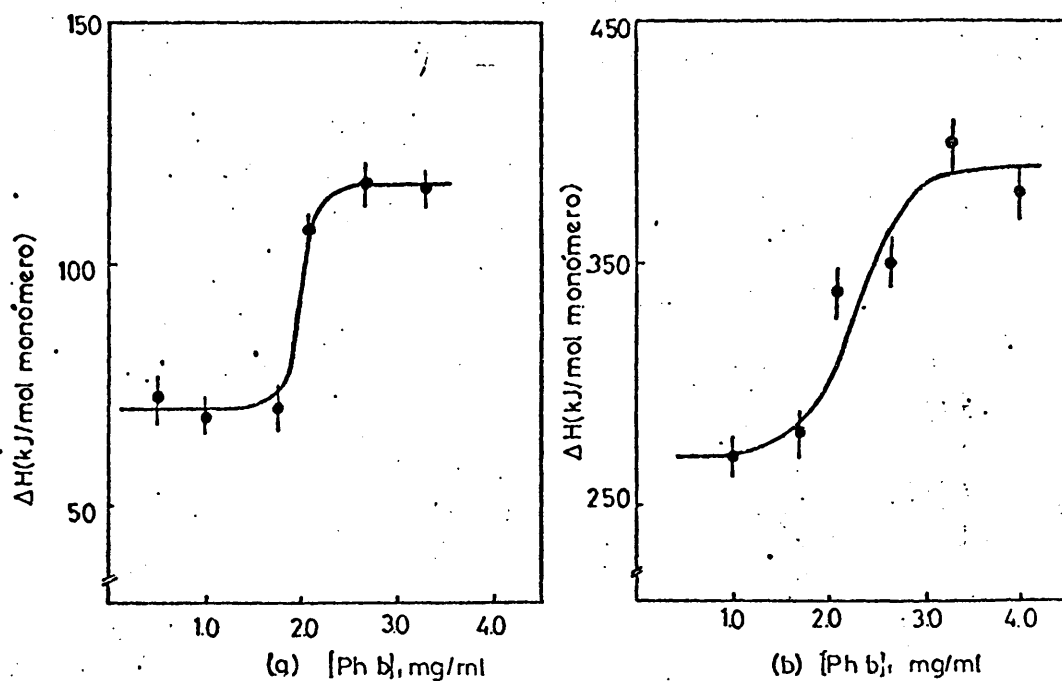


Fig. 66. - Interacción de la fosforilasa b por AMP 3' en función de la concentración de enzima. a) Manteniendo relación $[AMP\ 3']/[Ph\ b]$ para la 1ª saturación. b) A relación de la 2ª saturación.

con independencia de la concentración enzimática.

Se ha estudiado la variación de la entalpía de interacción de AMP-3' con la enzima en función de la concentración de enzima, manteniendo la relación $\frac{(\text{AMP-3'})}{(\text{enzima})}$ fija en un valor de la primera y segunda medias de las curvas de la fig. 65. Los resultados experimentales se muestran en la fig. 66. A partir de éstos, puede apreciarse que la entalpía de transición es diferente en las dos condiciones citadas, debido lógicamente a los distintos estados conformacionales inducidos por el nucleótido al saturar la primera y segunda clase de sitios de unión que reconoce en la enzima. Ambos valores entálpicos son aparentemente exotérmicos, a semejanza de IMP y al contrario de lo que ocurre con AMP. Notemos que el efecto simultáneo de las dos variables (concentración de enzima y relación $\frac{(\text{AMP-3'})}{(\text{enzima})}$) puede

llegar a enmascarar completamente la transición conformacional (fig. 64). A partir de la fig. 66 se obtienen unos valores de ΔH° de transición aparente iguales a: $-(47 \pm 5)$ kJ/mol monómero y $-(110 \pm 10)$

$\frac{\text{kJ}}{\text{mol monóm.}}$ para las transiciones $E_1' \longrightarrow E_1$ y $E_3' \longrightarrow E_3$,

siguiendo la nomenclatura utilizada en el capítulo V.

Los valores de la entalpía de transición, corregidos por la entalpía de dilución, son : $\Delta H(E_1' \longrightarrow E_1) = +(53 \pm 9)$

$\text{kJ/mol mon6mero y } \Delta H(E_3' \rightarrow E_3) = -(10 \pm 14)$, valores reales que muestran que E_3' y E_3 son el mismo estado termodinámico y que la transición $E_1' \rightarrow E_1$ es endotérmica.

En las figuras 67 y 68 se han representado los resultados obtenidos para la variación de la entalpía de interacción 2'dAMP-fosforilasa b en función de la concentración de enzima, a concentración de 2'dAMP constante y a relación de $\frac{(2'dAMP)}{(\text{enzima})}$ constante, respectivamente.

En ninguno de los dos casos detecta 2'dAMP la transición pero en el primero, al elevarse la relación $\frac{(2'dAMP)}{(\text{enzima})}$ a bajas concentraciones de fosforilasa (enzima)

b, se produce un aumento de la entalpía de interacción 2'dAMP-fosforilasa b debida muy probablemente a una interacción inespecífica del nucleótido con la enzima. La aparición de agregados de alto peso molecular, a saturación de 2'dAMP, inestables en las condiciones de los experimentos de ultracentrifugación puede servir de apoyo a esta hipótesis.

Las figuras 69 y 70 demuestran que 2'dIMP tampoco conduce a estados conformacionales termodinámicamente diferentes a concentraciones de enzima superiores e inferiores a la de transición. Sin embargo, la afinidad que este nucleótido muestra hacia los estados enzimáticos E_2 y E_2' es muy diferente, como lo evidencia la fig. 70.

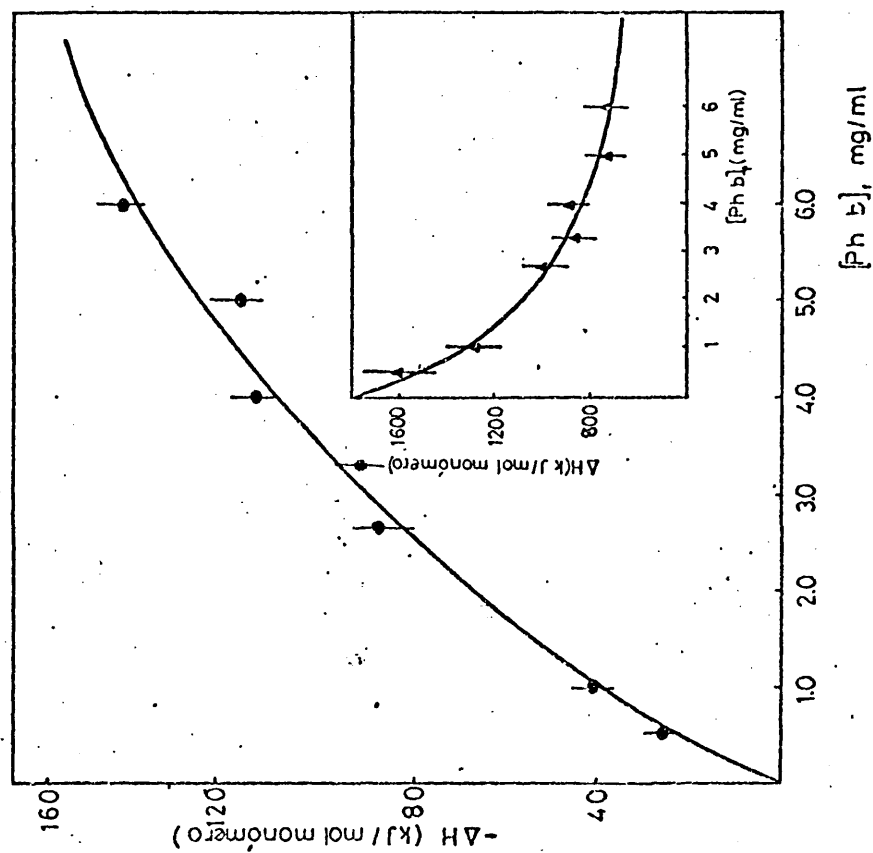


Fig. 67. - Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b-2'dAMP con la concentración de enzima, a 25°C. $[2'dAMP] = 1,5 \times 10^{-2}M$.

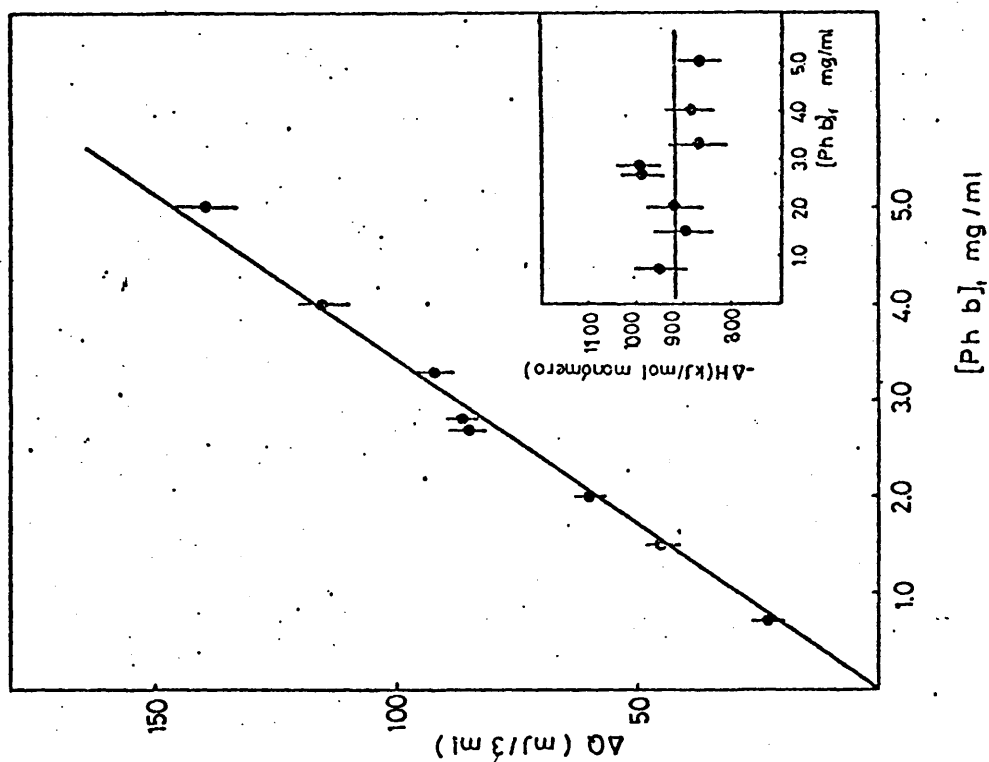


Fig. 68. - Variación del calor de interacción fosforilasa b-2'dAMP. Manteniendo constante la relación $[2'dAMP]/[Ph b]$. Recuadro: Entalpía de interacción de los resultados anteriores.

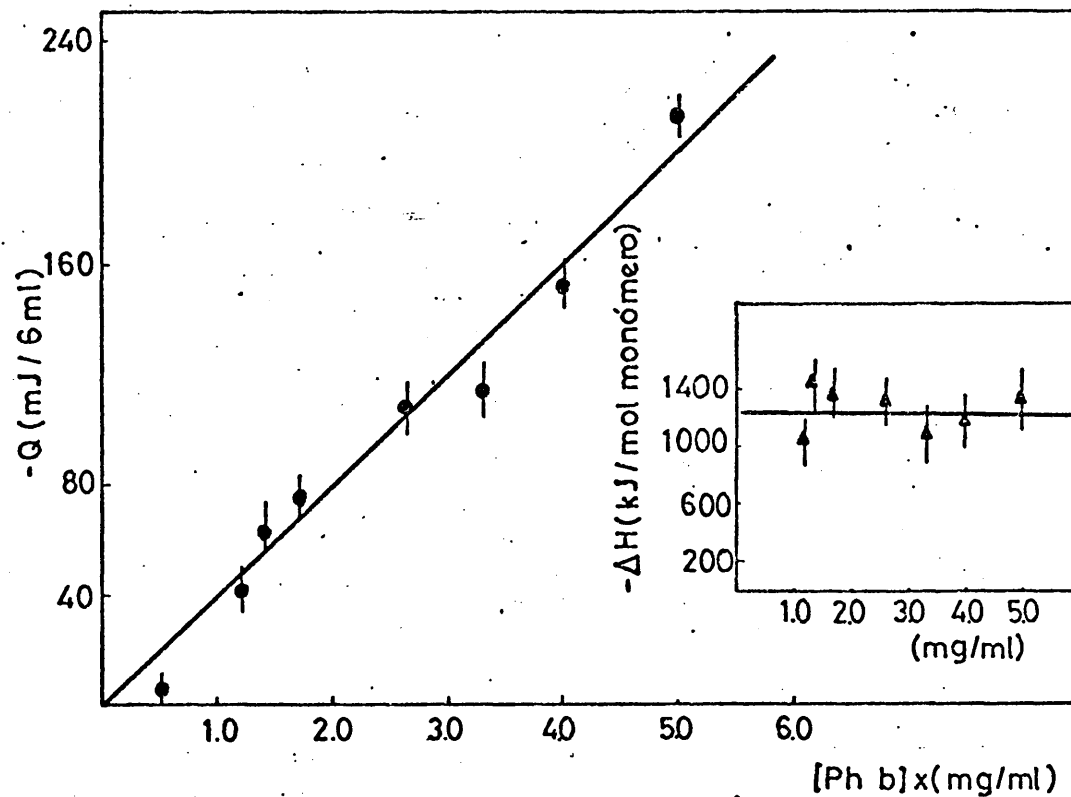


Fig. 69. - Variación de la entalpia de interacción de la fosforilasa b con 2'dIMP, en función de la concentración de enzima a 25°C.

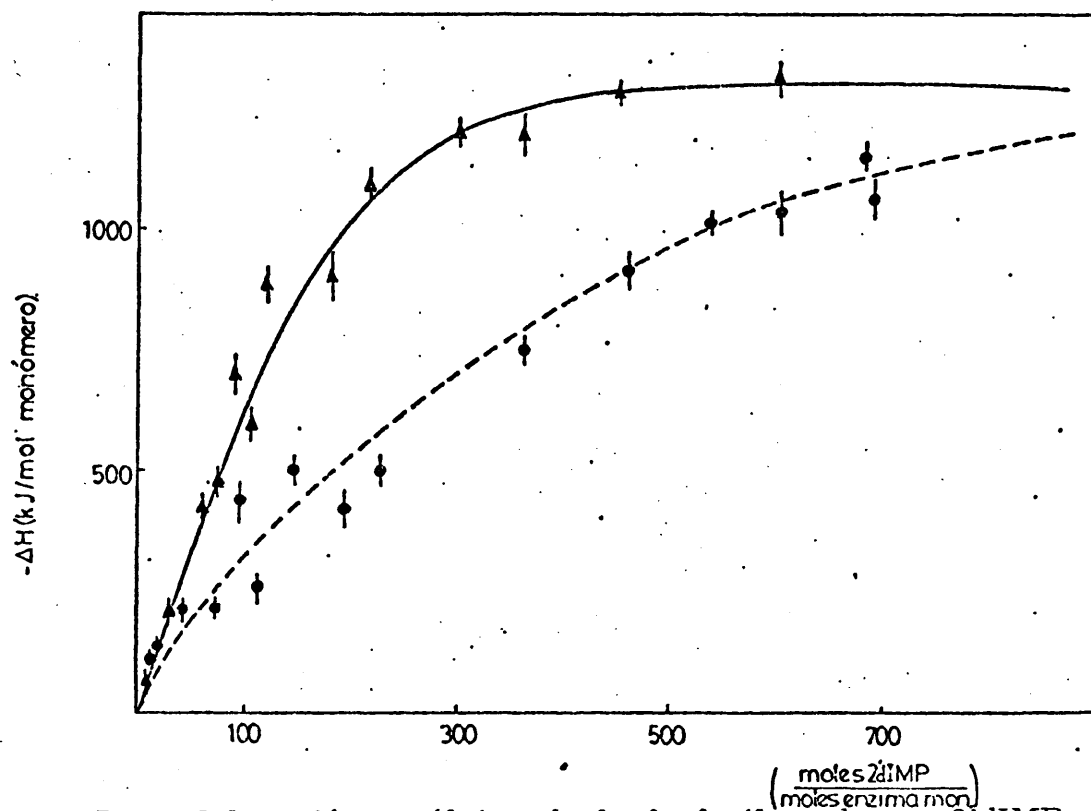


Fig. 70. - Valoración entálpica de la fosforilasa b por 2'dIMP, a 25°C.
 ----- [Ph b] = 1 mg/ml. ——— [Ph b] = 3 mg/ml.

Discusión

Los resultados calorimétricos obtenidos en este apartado requieren para su explicación la existencia de tres estados conformacionales. AMP-3' y AMP-2' conducen a parecidos estados conformacionales, como demuestran los valores de L_0 dados en la tabla XX. Esta conclusión se ve apoyada porque la fosforilasa b, en presencia de AMP-2' o de AMP-3' a concentraciones de saturación total del efecto entálpico, posee un coeficiente de sedimentación de 9.1 S. Los deoxiderivados han de conducir a estados muy diferentes como lo demuestran los datos termodinámicos de la tabla XX. El alto efecto entálpico producido por la acción de 2'-dAMP sobre la fosforilasa b puede ser justificado, al menos parcialmente, por la formación de especies enzimáticas de alto peso molecular que no son detectables por ultracentrifugación por ser su unión débil. No obstante, esta explicación no se ve apoyada por ningún dato experimental al intentar aplicarla a 2'-dIMP.

En cualquier caso, 2'-dIMP no puede ser considerado como un análogo formal de AMP, puesto que compite con este sólo parcialmente por los mismos sitios de unión.

Los datos termodinámicos dados en la tabla XXI muestran valores diferentes para la entalpía y entropía de interacción de los dos nucleóti-

TABLA XXI

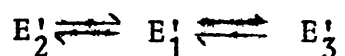
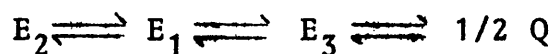
Propiedades termodinámicas asociadas a la formación de los complejos fosforilasa b-nucleótido

Nucleótido	$\frac{-\Delta G_I^{(1)}}{\text{kJ/mol dímero}}$	$\frac{-\Delta S_I^{(2)}}{\text{cal/(mol dímero) K}}$	$\frac{-\Delta G_{II}^{(1)}}{\text{kJ/mol dímero}}$	$\frac{-\Delta S_{II}^{(2)}}{\text{cal/(mol dímero) K}}$
AMP	40 ± 4	91 ± 10	15 ± 1	444 ± 40
2' AMP	41 ± 4	71 ± 8	9 ± 1	362 ± 30
3' AMP	40 ± 4	157 ± 14	1 ± 0,1	468 ± 47
2' dAMP	40 ± 4	305 ± 20	12 ± 1	1.066 ± 80
2' dIMP	$\Delta G^{(2)} = - 25 \pm 5 \qquad \Delta S = - 99 \pm 40$			

$(1)\Delta G = RT \ln^{(i)}_n K_T$, donde $\ln^{(i)}_n K_T = \ln^{(i)}_{L_o} K^{(i)}_K{}^2$	$(i = 1 \ 6 \ 2)$
$(2)\Delta G = RT \ln K_m$	

dos en los sitios de mayor afinidad, ΔH_I° y ΔS_I° . Estas diferencias pueden correlacionarse con las diferencias observadas previamente en el comportamiento cinético entre estos dos nucleótidos. Recordemos que la representación de la velocidad inicial de la fosforolisis del glucógeno en función de la concentración de AMP-3' presenta, a 25°C una primera región, hasta $2,5 \times 10^{-4}M$ en la cual el nucleótido activa a la enzima, hasta niveles de un 120% de su actividad residual. Este efecto es función de la concentración de fosfato y la temperatura. A concentraciones superiores de AMP-3', este nucleótido llega a inhibir hasta niveles similares a los de AMP-2', que a 25°C no presenta esta bifuncionalidad catalítica en el proceso de inhibición. Los datos termodinámicos (tabla XXI) indican un mayor efecto conformacional sobre la fosforilasa b, mayor ΔS_I° y ΔH_I° , para AMP-3' que para AMP y AMP-2'. Lo que puede ser atribuido al mayor porcentaje de forma syn que presenta AMP-3' respecto de AMP (119), conformación que es la estabilizada en el complejo nucleótido-enzima, según se concluyó anteriormente. El menor valor entálpico y entrópico asociado a la interacción de estos nucleótidos con la primera clase de sitios corresponde a AMP-2', concordantemente ya que este nucleótido es el que menor porcentaje en forma syn presenta en disolución.

Sin embargo, ambos nucleótidos (AMP-2' y AMP-3') no se diferencian en los valores de las constantes de equilibrio y propiedades termodinámicas de la unión de los mismos al tipo de sitios de menor afinidad hacia el nucleótido, que son los sitios de unión directamente relacionados con la gran activación del proceso catalítico producida por AMP. Por tanto, ambos nucleótidos han de actuar de manera similar, como efectivamente ocurre en estudios cinéticos, respecto de la agregación de la fosforilasa b y del desplazamiento de AMP-C¹⁴. Como se expuso en resultados, AMP-2' y AMP-3' llevan a la enzima, a saturación total del efecto entálpico, hacia un estado similar o idéntico al E₃¹, que, por consiguiente, ha de ser inactivo. El pequeño efecto de activación producido por AMP-3' a bajas concentraciones de nucleótido a 25°C, así como por AMP-2' a 16°C (concentraciones que corresponden a la zona de saturación de los sitios de mayor afinidad hacia el nucleótido en la curva calorimétrica), puede, por tanto, ser atribuido a un estado próximo al E₁¹, estado producido por AMP al saturar los sitios de mayor afinidad en la enzima (a concentración de esta <1.5 mg/ml). Otra posible explicación puede obtenerse del esquema conformacional propuesto para explicar los resultados termodinámicos obtenidos para la acción de AMP sobre la fosforilasa b a 25°C (capítulo V):



Esta segunda explicación permitiría entender la pequeña activación como debida a la presencia de un pequeño porcentaje del estado E_3 en el equilibrio, estado que se estabiliza fuertemente por el fosfato y que junto a Q se ha sugerido que son los únicos apreciablemente activos (capítulo V). Las diferencias en el nivel de activación producida por AMP-3' y AMP-2' observadas en función de la concentración de fosfato y de la temperatura se pueden entender como debidas a la acción de ambos factores sobre el equilibrio $E'_1 \rightleftharpoons E_3$. Introduciendo la hipótesis de que, a diferencia de AMP, AMP-2' y AMP-3' han de predominar en su efecto sobre el fosfato, para llevar a los estados conformacionales inactivos de la fosforilasa b, las conclusiones obtenidas a partir de los resultados cinéticos se ven fuertemente apoyadas, es decir, se ven reforzadas las hipótesis hechas acerca de que las interacciones homotrópicas, entre moléculas de nucleótido, y heterotrópicas, entre nucleótido y fosfato, habrían de ser muy fuertes, existiendo además una competencia parcial por los sitios de unión respectivos, que no se da o se da en mucho menor grado en el caso de AMP.

A pesar de las grandes diferencias entre las entalpías de interacción de 2'-dAMP-fosforilasa b y las de AMP-2', AMP-3' y AMP con la enzima (tabla XIX), las constantes obtenidas son muy similares en todos casos (tabla XX). Esto parece indicar que la unión de la molécula de AMP a la fosforilasa b es dirigida por la base del nucleótido que es la que ha de reconocer los sitios de mayor y menor afinidad, si bien el carácter entálpico de la interacción con estos último está fundamentalmente asociado al grupo fosfato. La ribosa y el fosfato en C(5') son de gran importancia en los cambios conformacionales producidos por el nucleótido y, lógicamente, han de participar en la transmisión de efectos estructurales. Así, 2'dAMP, AMP-2' y AMP-3' presentan una cooperatividad homotrópica similar a la de AMP en la saturación de los sitios de unión de menor afinidad. En los diferentes análogos en ribosa y fosfato estudiados se ve afectada la cooperatividad homotrópica en el proceso de saturación de los sitios de mayor afinidad hacia el nucleótido respecto de AMP. Los resultados expuestos y los dados en el apartado anterior, con análogos de AMP por modificación química de la base, demuestran que en la cooperatividad homotrópica entre los sitios de unión de mayor afinidad hacia el nucleótido sólo participa (de la molécula de AMP) el anillo de adenina, en tanto que en la cooperatividad homotrópica entre los sitios de débil afinidad ha de

participar toda la molécula de AMP, si bien la base conserva el efecto dominante, ya que son alteraciones en la misma las que más drásticamente la afectan. El carácter director de la base en los cambios estructurales se hace manifiesto también a partir de los resultados ya expuestos, de protección de los grupos cisteína lentos de la fosforilasa b.

Estas conclusiones apoyan la hipótesis de que los sitios de menor afinidad son importantes directa o indirectamente en el mecanismo catalítico, ya que alteraciones de las distintas partes de la molécula de AMP afectan a la catalítisis y no sólo las alteraciones en la base, aunque en muy distinto grado a lo observado desde un punto de vista entálpico, lo que sirve para corroborar la separación de la acción de AMP sobre la fosforilasa b en dos facetas: una estructural y otra catalítica. El papel de la primera clase de sitios sería pues, puramente estructural, es decir, permitiría la creación de la segunda clase (de menor afinidad hacia el nucleótido).

Por otra parte, los valores de las constantes $K_{1/2}$ caza (tabla XVIII) obtenidas por diálisis en el equilibrio concuerdan con los resultados calorimétricos en cuanto muestran que la afinidad del nucleótido hacia la primera clase de sitios de la fosforilasa b de

participar toda la molécula de AMP, si bien la base conserva el efecto dominante, ya que son alteraciones en la misma las que más drásticamente la afectan. El carácter director de la base en los cambios estructurales se hace manifiesto también a partir de los resultados ya expuestos, de protección de los grupos cisteínicos lentos de la fosforilasa b.

Estas conclusiones apoyan la hipótesis de que los sitios de menor afinidad son importantes directa o indirectamente en el mecanismo catalítico, ya que alteraciones de las distintas partes de la molécula de AMP afectan a la catalítisis y no sólo las alteraciones en la base, aunque en muy distinto grado a lo observado desde un punto de vista entálpico, lo que sirve para corroborar la separación de la acción de AMP sobre la fosforilasa b en dos facetas: una estructural y otra catalítica. El papel de la primera clase de sitios sería pues, puramente estructural, es decir, permitiría la creación de la segunda clase (de menor afinidad hacia el nucleótido).

Por otra parte, los valores de las constantes $K_{1/2}$ para (tabla XVIII) obtenidas por diálisis en el equilibrio concuerdan con los resultados calorimétricos en cuanto muestran que la afinidad del nucleótido hacia la primera clase de sitios de la fosforilasa b de

pende principalmente de la base del nucleótido. En la tabla XVIII se dan las constantes relativas a AMP, de activación e inhibición. La discordancia con las $K_{1/2}$ *caza* es evidente. La separación, por tanto, de las acciones estructural y catalítica lo es también.

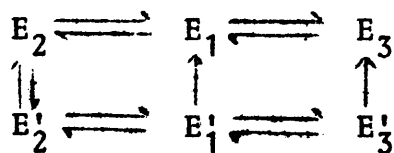
Es preciso resaltar que la cooperatividad - observada en los procesos de transición conformacional mediante este estudio microcalorimétrico no coincide con la presencia o ausencia de cooperatividad en la protección de las cisteínas lentas de la fosforilasa b contra DTNB por estos nucleótidos. Esta discrepancia es justificable si se considera que las acciones homotrópicas detectables por medidas entálpicas no afectan directamente a dichos -SH lentos, exigiendo su protección, en algunos casos, la unión del nucleótido a la subunidad enzimática en la que dicho -SH se halle. Esta explicación exigiría, pues, una directa participación del nucleótido en la protección del grupo -SH, ya que no directamente (ver la discusión de los resultados cinéticos del apartado primero de este capítulo) por una disminución de su accesibilidad al disolvente; proceso que ha de ser función, en su mecanismo, de las distancias interatómicas de los grupos implicados en él. Lógicamente, diferentes posicionamientos del nucleótido en el complejo (nucleótido-enzima) han de alterar tales dis-

tancias interatómicas.

El hecho de que la transición conformacional enzimática producida por la concentración de enzima sea detectada sólo por AMP-2' y por AMP-3' y, aún en estos casos, de muy diferente manera, demuestra que en ella es de gran importancia la posición del fosfato y las alteraciones en el C(2') de la ribosa, modificaciones que afectan al porcentaje de conformación *syn* del nucleótido. Así, los 2'-deoxiderivados no conducen a diferentes estados termodinámicos del sistema enzimático, por encima y por debajo del intervalo de concentración de enzima de transición. Sin embargo, 2' dIMP reconoce como distintos los dos estados conformacionales enzimáticos estabilizados en función de la concentración de enzima puesto que su afinidad hacia éstos es diferente (fig. 69). Esta transición admite flexibilidad en los grupos químicos de la base de la molécula de AMP. Este comportamiento es similar al observado por estudios cinéticos con análogos de AMP, lo cual refuerza la posibilidad de que la transición conformacional citada posea una significación reguladora del proceso catalítico.

Utilizando la nomenclatura introducida para el sistema AMP-fosforilasa b (capítulo V), el esquema conformacional enzimático que parece describir el comportamiento de los nucleótidos estudiados en

este apartado excepto 2' dIMP es :



Señalemos que los estados E_1 , E'_1 , E_3 y E'_3 entenderse como similares pero no idénticos a los alcanzados en presencia de AMP. Es de destacar la ausencia del tetrámero y que para AMP-3', desde un punto de vista termodinámico $E_3 = E'_3$. Por otra parte, los deoxiderivados parecen reconocer selectivamente el estado E_2 , no uniéndose a E'_2 , ya que los valores del coeficiente de sedimentación de los correspondientes complejos enzima-nucleótido son 8,6S y no conducen a diferentes estados conformacionales finales a concentraciones de enzima superiores e inferiores a la de transición.

- Discusión general -

I - Introducción:

Desde la primera formulación alostérica (12), en numerosas enzimas se ha detectado un comportamiento cinético sigmoideo que, en principio, indica la presencia de fenómenos alostéricos. El "modelo concertado" de Monod y col. (17) pronto se mostró insuficiente para poder describir la totalidad de los datos experimentales acumulados. La primera modificación a dicho modelo correspondió a Koshland y col (13) que establecieron el "modelo secuencial", cuya principal innovación consiste en la eliminación del principio de simetría del modelo concertado, principio asociado a fuertes interacciones ligando-proteína e interacciones intersubunidad. Ambos modelos permiten la explicación del aparente incremento en la afinidad de la enzima hacia un ligando al incrementar la cantidad de ligando unida, fenómeno que se denomina "cooperatividad positiva".

Más tarde (127,128) se descubrieron fenómenos de "cooperatividad negativa" entendiendo por tal el efecto contrario al anterior en el que la afinidad aparente de la proteína hacia un ligando decrece con la unión progresiva del mismo a la proteína. Este fenómeno podía ser explicado haciendo uso del modelo de Koshland previamente citado, pero no del "modelo concertado", (129).

No obstante, ninguno de estos dos modelos alostéricos permite explicar la coexistencia de ambos tipos de cooperatividad, positiva y negativa, en la misma proteína hacia el mismo ligando. El modelo secuencial fue rápidamente ampliado para que abarcara estos dos fenómenos conociéndose como "modelo secuencial generalizado" (14,15).

La rígida formulación de las hipótesis de partida del modelo concertado no permite la explicación de ambos tipos de cooperatividad y su coexistencia, sin modificaciones sustanciales en las mismas. Recientemente, Viratelle y Seydoux (130) han propuesto un modelo alostérico, denominado "pseudoconservativo", que permite la comprensión de los anteriores hechos experimentales siguiendo fundamentalmente las hipótesis del modelo concertado. En este modelo se elimina parcialmente el principio de máxima conservación de la simetría del modelo concertado en base a los resultados obtenidos para algunas proteínas en disolución que muestran que la existencia de cooperatividad negativa va ligada a una cierta asimetría estructural de la proteína (131, 132). De este modo y tan sólo aceptando la presencia de un estado conformacional enzimático con una parcial pérdida de simetría se puede explicar la coexistencia de ambos tipos de cooperatividad, respetando los restantes postulados del modelo concertado.

Tanto el "modelo secuencial generalizado" como el "modelo pseudoconservativo" permiten la existencia de más de una clase de sitios de unión, cada una de ellas con diferente afinidad hacia el ligando. No ocurre así con el modelo concertado.

II - Generación de diferentes sitios de unión a través de estados conformacionales enzimáticos intermedios: Una formulación alostérica para explicar los resultados experimentales obtenidos con la fosforilasa b

Esta formulación alostérica puede ser considerada como una extensión del "modelo concertado" (12) que permite explicar las curvas que exhiben varias regiones de saturación diferenciadas, al representar la función de saturación, \bar{Y} , frente a la concentración de ligando. Admite asimismo la coexistencia de cooperatividad positiva y negativa en el proceso de saturación global de los sitios de unión específicos de un ligando por éste. Es preciso señalar que la reciente ampliación del "modelo concertado" hecha por Viratelle y Seydoux (130), conocida como "modelo pseudoconservativo" al igual que el "modelo secuencial generalizado" (14,15), permiten explicar las curvas de saturación que muestran diferentes regiones en función del log. de la concentración o del log de la concentración reducida de ligando, pero no en función de la concentra

ción o concentración reducida de ligando.

A.- Postulados básicos:

Si en una enzima se hallan presentes N-clases de sitios de unión para un ligando que muestran cooperatividad positiva en el proceso de saturación por dicho ligando, el comportamiento del sistema puede ser interpretado considerando las siguientes hipótesis de partida:

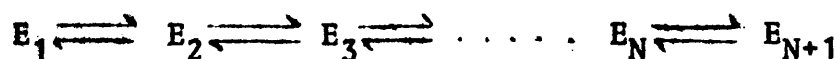
a) Para un oligómero de n-subunidades pueden existir aparentemente N-clases de sitios de unión hacia un ligando, por monómero. El número de sitios de unión equivalentes de cada tipo serán: $a_i \cdot n$ donde a_i puede ser un número entero (1, 2, .. j). Por tanto, el número total de sitios de unión de todas las clases en la enzima hacia el ligando es:

$$n \cdot \sum_{i=1}^N a_i$$

El coeficiente a_i no será igual a la unidad cuando exista cooperatividad entre más de n-centros de unión (por ejemplo: si se producen estados intermedios agregados o pseudoagregados (véase la discusión del apart. IV-4)).

b) La enzima presenta entonces (N+1) estados conformacionales en equilibrio. No obstante, en ausencia de ligando la situación puede ser reducida a un

simple equilibrio entre dos estados, resultando despreciable la participación de los demás equilibrios.



c) El equilibrio entre cada dos estados conformationales consecutivos obedece al "modelo concertado" de Monod, al menos para la fosforilasa b (12). Siguiendo la nomenclatura ya clásica, T_i y R_i son los estados enzimáticos en los que las afinidades de la clase de sitios i -ésima hacia el ligando es menor o mayor, respectivamente.

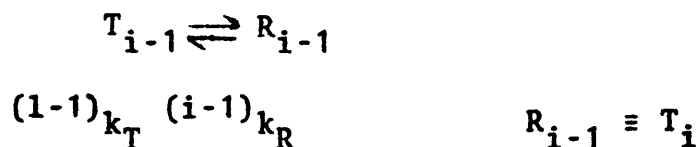
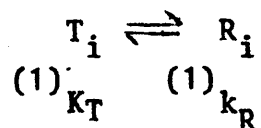
d) La "creación aparente" de una clase $(i+1)$ de sitios exige la saturación de la clase (i) , de mayor afinidad hacia el ligando, estabilizando así un estado conformational, E_{i+1} , que actúa simultáneamente como R_i , respecto de la clase i -ésima de sitios y como T_{i+1} , respecto de la clase $(i+1)$ ésima.

Para describir los N -equilibrios posibles son precisos los siguientes parámetros:

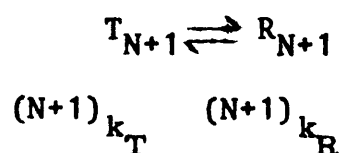
1) Las N constantes de equilibrio transconformacional : $(1)L_o, (2)L_o, \dots, (n)L_o$ definidas como:

$$(i)L_o = (T_i)_o / (R_i)_o$$

2) Las $2N$ constantes intrínsecas de disociación del ligando de los distintos sitios de unión en los diferentes estados conformationales:



.....



Utilizando los parámetros descritos, la función de saturación (\bar{Y}_t) para un ligando puede escribirse, siguiendo la terminología de Monod y col. (12):

$$\bar{Y}_T = \bar{Y}_1 + f_1 \bar{Y}_2 + f_1 f_2 \bar{Y}_3 + \dots + f_1 f_2 \dots f_{N-1} \bar{Y}_N \quad (D-1)$$

donde $f_1 f_2 \dots f_{N-1}$ representan las fracciones de enzima en las que se ha saturado completamente la primera, segunda(N-1) clase de sitios de unión, respectivamente. Si la cooperatividad homotrópica en el proceso de saturación de las distintas clases de sitios es elevada los valores de f_i ($i = 1, 2, \dots (N-1)$) serán muy similares a los correspondientes valores de \bar{Y}_i , función de saturación de la clase i-ésima de sitios, ya que en este caso la población de cada estado enzimático cuya clase de sitios esté parcialmente saturada ha de ser mínima. Podemos escribir entonces:

$$\bar{Y}_T = \bar{Y}_1 + \bar{Y}_1 \bar{Y}_2 + \dots + \bar{Y}_1 \bar{Y}_2 \dots \bar{Y}_N = \sum_{i=1}^N \frac{1}{i} \bar{Y}_i \quad (D-2)$$

La función de saturación, \bar{Y}_i de cada clase de sitios puede ser calculada utilizando la ecuación de Monod y col (12) que para el caso general de unión no-exclusiva del ligando adopta la forma:

$$\bar{Y}_i = \left(\frac{\alpha_i}{1 + \alpha_i} \bar{R}_i + \frac{C_i \alpha_i}{1 + C_i \alpha_i} (1 - \bar{R}_i) \right) \frac{a_i}{\sum_{i=1}^N a_i} \quad (D-3)$$

donde R_i es la función de estado de la clase i -ésima de sitios:

$$\bar{R}_i = \frac{(1 + \alpha_i)^{na_i}}{(1)_{L_0} (1 + C_i \alpha_i)^{n \cdot a_i} + (1 + \alpha_i)^{na_i}} \quad (D-4)$$

y el factor $\frac{a_i}{\sum_{i=1}^N a_i}$ se introduce para que sea $\bar{Y} \leq 1$, es decir, es un factor de normalización.

En esta ecuación los diferentes valores de R_i se refieren a los diferentes estados conformacionales con más elevada afinidad hacia los diferentes clases de sitios. El coeficiente de unión no-exclusiva, C_i , es:

$$C_i = \frac{(i)_{k_T}}{(i)_{k_R}} \text{ y } \alpha_i, \text{ es la concentración reducida de ligando: } \alpha_i = (S) / (i)_{k_R}.$$

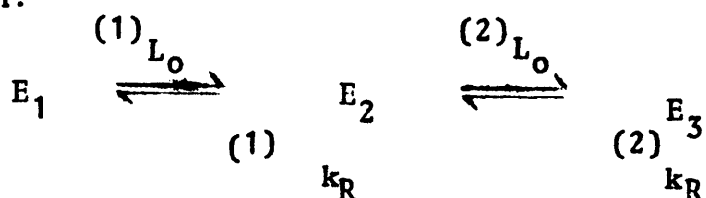
Las anteriores expresiones se simplifican enormemente si se considera que la unión del ligando a las diferentes clases de sitios de unión es exclusiva. Entonces: $(i)_{k_R} \ll (i)_{k_T}$ y $C_i \approx 0$. Además, tan solo es

preciso determinar las N constantes intrínsecas de disociación a los diferentes estados $R^{(i)}_{k_R}$ y las N-constantes de equilibrio transconformacional $^{(i)}L_0$. La función de saturación de la clase i-ésima de sitios (\bar{Y}_i) viene dada por la siguiente ecuación:

$$\bar{Y}_i = \frac{a_i}{\sum_{i=1}^N a_i} \frac{\alpha_i (1+\alpha_i)^{a_i n-1}}{^{(i)}L + (1+\alpha_i)^{na_i}} \quad (D-5)$$

siendo $^{(i)}L = \frac{T_i}{R_i}$ a una concentración dada de ligando.

La fig. 71 muestra los valores calculados para la función de saturación \bar{Y} en un sistema enzimático de dos subunidades ($n=2$) con dos clases de sitios de unión ($N+2$), para diferentes valores de los parámetros $^{(i)}L_0$ y $^{(i)}k_R$. En los dos casos: $a_i = 1$. La representación gráfica de \bar{Y}_t corresponde a dos equilibrios alostéricos entre tres estados conformacionales, de acuerdo con lo establecido por el modelo de generación de sitios de unión:



Puede observarse en dicha figura 71 que un sistema con dos clases diferentes de sitios de unión a veces muestra un comportamiento aparentemente idéntico al esperado para un sistema regido por el "modelo concertado", que exhibiera cooperatividad homotrópica entre dos si-

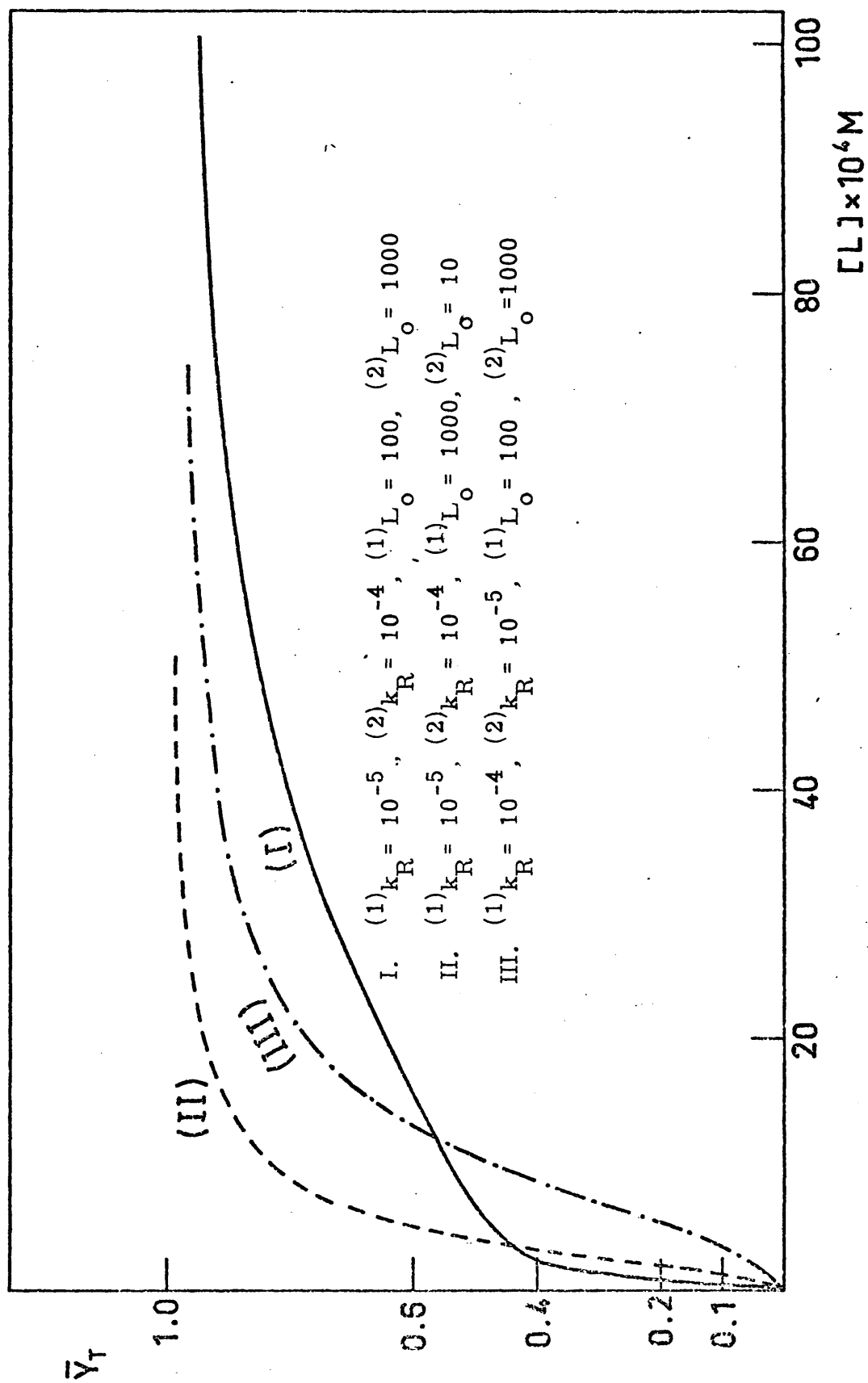


Fig. 71.- Aplicación del modelo a un caso con tres estados conformacionales en equilibrio, con dos tipos de sitios de unión ($N=2$) y cada uno con dos sitios equivalentes ($n=2$) y $a_i=1$. Las curvas I, II y III corresponden a diferentes valores de $(1)k_R$, $(2)k_R$, $(1)L_O$ y $(2)L_O$.

tios de unión idénticos e independientes (en este caso particular). Así pues para distinguir claramente en la función de saturación total las dos regiones que corresponden a la saturación de cada clase de sitios es preciso que:

$$(1) k_R \ll (2) k_R, \text{ que } (1) L_o \text{ y } (2) L_o \text{ sean elevadas y que } (2) L_o \gg (1) L_o .$$

Este es el caso del sistema fosforilasa b - AMP y, dada la diferente alteración relativa en la afinidad hacia sus dos tipos de sitios de unión por los sustratos, permite explicar el comportamiento cinético ajustable al modelo concertado de dicho sistema.

En general, el modelo propuesto posibilita la explicación de curvas de saturación que poseen N_t regiones con características sigmoideas e hiperbólicas. La generación de sitios de unión cuya saturación exhiba características de cooperatividad negativa puede ser explicada fácilmente considerando que el equilibrio entre algunos de los estados conformacionales enzimáticos sigue el "modelo pseudoconservativo" (130).

La existencia de cooperatividad negativa es precisa una cierta asimetría molecular, que permite la subdivisión de los n -sitios equivalentes de un oligómero en dos series de $\frac{n}{2}$ sitios de unión equivalentes. Por tanto, para un sistema de N_t regiones que muestran ca-

racterísticas de cooperatividad positiva y negativa la función de saturación total de algunas clases de sitios puede ser expresada en la forma siguiente (130):

$$\bar{Y}_i = \frac{a_i}{\sum_{i=1}^M} \left[\frac{{}^{(i)}L_0 C_i \alpha_i (1 + C_i \alpha_i)^{a_i n - 1} + 1/2 (1 + \alpha_i)^{1/2(a_i n - 1)} (1 + d_i \alpha_i)^{1/2(a_i n - 1)} \alpha_i [(1 + d_i \alpha_i) + d_i (1 + \alpha_i)]}{(1 + \alpha_i)^{a_i n / 2} (1 + d_i \alpha_i)^{a_i n / 2} + {}^{(1)}L_0 (1 + C_i \alpha_i)^{n a_i}} \right]$$

En la expresión anterior se ha tenido en cuenta que la unión no es exclusiva al estado R_i . En la ecuación, d_i , es una medida de la heterogeneidad de la unión del ligando al estado conformacional pseudoisólogo (asimétrico) y es igual a la relación entre las constantes microscópicas de disociación del ligando a los sitios de mayor afinidad ${}^{(i)}_{k_R}$ y las constantes de disociación del ligando de los sitios de menor afinidad ${}^{(i)}_{k_R 1}$ del mismo estado conformacional (E_i).

Las funciones de saturación para el resto de los sitios pueden ser descritas utilizando las ecuaciones (D-3) (D-4), dadas para el modelo concertado.

El "modelo pseudoconservativo" puede abarcar también la descripción de dos conjuntos de $a_i \cdot n$ sitios-equivalentes de unión por oligómero (de n subunidades) (130). Así, pues, utilizando la expresión dada por el "modelo pseudoconservativo" para la función de saturación pueden describirse todas las regiones de la curva de saturación global, considerando que $d_i = 1$, el mode-

lo concertado.

B.- Consideraciones adicionales.

Quizá sea preciso señalar las dos importantes diferencias existentes entre la formulación alostérica propuesta y la de los modelos alostéricos usuales:

a) La aceptación de n ($n > 2$) conformaciones enzimáticas estables termodinámicamente en equilibrio.

b) La no necesidad de la presencia de todas las clases de sitios de unión ya preformados en la enzima, sino que las moléculas de efector participen, en alguna manera aún no esclarecida, en la formación de nuevos centros de unión.

La diferencia señalada en el punto (a) es bastante lógica, si se considera desde un punto de vista termodinámico el sistema ligando-enzima, ya que entre dos estados extremos de equilibrio del sistema (por ejemplo, dímero en ausencia de ligando y tetrámero) es obligado considerar una serie de estados intermedios cada uno de ellos más próximo al estado de equilibrio final. Weber (133) presenta dos importantes objeciones a los modelos alostéricos usuales: (1) desde un punto de vista termodinámico estos modelos realizan una gran simplificación del problema (por otra parte, muy útil) al considerar sólo dos estados conformacionales en equilibrio y (2) el concepto de equilibrio transconformacional, su implicación tautomérica, hace

olvidar la variable concentración de enzima y, por tanto, desvía la atención de los investigadores de los problemas de agregación que, a veces, tienen lugar, aunque sólo sea como pasos intermedios, en los procesos de activación enzimática. Ambas objeciones son replicadas claramente por la formulación propuesta. Señalemos que, al abolir la segunda objeción, el estudio de la variable concentración enzimática se imponía obviamente. Los resultados obtenidos, véase el capítulo V, muestran la enorme importancia de la misma. Notemos que el hecho de haber sido detectados una serie de estados intermedios, termodinámicamente estables en determinadas condiciones experimentales, no significa que éstos sean los únicos que adopta el sistema en su desplazamiento desde el estado dímero en ausencia de ligando hasta el tetrámero, sino que probablemente en las condiciones experimentales utilizadas y, por tanto, no detectables en los estados de microcalorimetría en el equilibrio realizadas, pero tal vez posibles de detectar utilizando otras técnicas (fundamentalmente de relajación química).

La presencia de efectos alostéricos en proteínas monoméricas es un problema importante para los modelos alostéricos clásicos (134-137). Estos casos anómalos pueden ser explicados, al menos, de dos maneras diferentes:

I) Suponiendo la existencia de efectos alostéricos intramonoméricos entre regiones proteínicas muy separadas.

II) Siguiendo la primera hipótesis de nuestra formulación, las interacciones alostéricas entre moléculas de enzima ensambladas dinámicamente, denominadas "cuasi asociadas", tan sólo necesitan que $a_i > 1$. Los resultados dados con los sistemas nucleótido-enzima estudiados muestran este tipo de comportamiento.

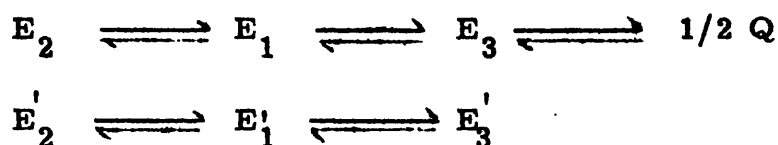
La explicación I sólo puede ser entendida si las regiones interiores de la proteína se ven afectadas por las interacciones alostéricas. Ello implicaría una gran flexibilidad del "corazón" de la proteína, que permitiera rotaciones o deformaciones de grandes entidades submonoméricas en la proteína. Es realmente difícil de aceptar tal comportamiento para proteínas globulares, elipsoidales o tipo varilla rígida considerando las propiedades físicas de éstas. A causa de que la mayor parte de las proteínas conocidas actualmente son de este tipo, esta explicación poseerá un margen de aplicación muy escaso.

La explicación II sólo implica la participación de la superficie enzimática o de regiones próximas a ella. Por otra parte, los centros alostéricos suelen estar situados en la superficie enzimática, lo cual apoya esta segunda explicación.

CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado una formulación alostérica basada en la "creación aparente" de nuevas clases de sitios de unión a través de la estabilización de estados conformacionales enzimáticos intermedios.

2.- La fosforilasa b sufre una transición conformacional dependiente de la concentración enzimática, que afecta a las dos clases de sitio de unión de AMP y a los de fosfato. Se propone en base a lo anterior el siguiente esquema cinético para explicar el comportamiento de la fosforilasa b.



3.- En el esquema conformacional solo los estados E_3 y Q han de mostrar actividad catalítica, es decir, solo los sitios enzimáticos de menor afinidad hacia AMP son los que, en alguna manera no exactamente conocida, intervienen directamente, en el proceso catalítico.

4.- La acción del AMP sobre la enzima puede descomponerse en dos facetas independientes (una estructural y otra de acción directa, aunque no sencilla, sobre el mecanismo catalítico).

5.- A la base púrica de nucleótido le corresponde el papel director en la acción estructural de este sobre la enzima, en tanto que en la acción catalítica es el fosfato el grupo mas importante.

6.- El complejo (enzima-AMP) se estabiliza al adoptar el nucleótido la conformación syn, la cual se favorece en dicho complejo por quelación de AMP con Mg^{++} unido a la enzima.

7.- Los sitios de unión de menor afinidad hacia AMP (implicados en la catálisis) y los de fosfato (solo aquellos cuya saturación adquiere características de alta cooperatividad homotrópica en presencia de glucógeno) parecen hallarse muy próximos en la superficie enzimática.

8.- La transición conformacional enzimática inducida termicamente, consiste en una transición entre dos estados conformacionales enzimáticos en disolución, que pasan por un estado intermedio estable solo en un estrecho intervalo de temperatura.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Municio, A. M. En "Interacciones Moleculares" (1974), ppg. 267-496. Ed. Rioduero. MADRID.
- 2.- Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) "Regulation in Metabolism". John Wiley, London.
- 3.- Koshland, D.E. (1970) en "The Enzymes", 3^a Ed. (Boyer, P.O. ed.) I., ppg. 341-396. Academic Press, New York
- 4.- Fischer, E.H., Pocker, A., y Saari, J.C. (1970) "Assays in Biochemistry" (Campbell, P.N., y Dickens, F., eds.) 6, 23-68. Academic Press, London.
- 5.- Graves, D.J., y Wang, J.H. (1972) en "The Enzymes" 3^a Ed. (P.D. Boyer, ed.) VII, ppg. 435-482. Academic Press, New York.
- 6.- Busby, S.J.W. y Radda, G.K. (1976) En: Curr.Top. Cell. Regul. (Horecker, B.L. and Stadtman, E.R. eds.) Vol. 10, pp. 89-160, Academic Press, New York.
- 7.- Madsen, N.B. (1964) Biochen. Biophys. Research Comm. 15, 390-395.
- 8.- Black, W.J., y Wang, J.H. (1968) J. Biol. Chem. 243, 5892-5898.
- 9.- Avramovic, O., y Madsen, N.B. (1968). J. Biol. Chem. 243, 1656-1662
- 10.- Madsen, N.B. y Shechosky, S. (1967) J. Biol. Chem. 242, 3301-3307.
- 11.- Kastenschmidt, L.L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E.

- (1968) Biochemistry 7, 4543-4556.
- 12.- Monod, J., Wyman, J., y Changeux, J.P. (1965) J.Mol. Biol. 12, 88-118.
- 13.- Koshland, D.E., Nemthy, G. y Filmer, P. (1966) Biochemistry 5, 365-385.
- 14.- Haber, J.E., y Koshland, D.E., Jr. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 2087-2093.
- 15.- Cook, R.A., y Koshland, D.E., Jr. (1970) Biochemistry 9, 3337-3342.
- 16.- Wang, J.H., Kwok, S.C., Wirch, E. y Suzuki, I.- (1970) Biochem. Biophys. Research Comm. 40, -- 1340-1347.
- 17.- Ho, H.C., y Wang, J.H. (1973) Biochemistry 12, - 4750-4755.
- 18.- Morange, M., García Blanco, F., Vandenbunder, B. y Buc, H. (1976), Eur. J. Biochem. 65, -- 553-563.
- 19.- Larner, J. y Villar-Palasi, C. (1971). En "Current Topics in Cellular Regulation" (Horecker, B.L., and Stadtman, E. R., Eds.) 3, 196-236. Academic Press, New York.
- 20.- Ebashi, S., y Endo, M. (1960) Quart. Rev. in Biophys. 2, 351-384.
- 21.- White, A., Haudler, P., Smith, E. "Principios de Bioquímica", pgs. 439-442. Ed. del Castillo.
- 22.- Mackaskie, L.E., y Palmer, T.N. En los "Abstracts" del décimo congreso de la Unión Internacional de

Bioquímica, Hamburgo (1976). Referencia: 07-4-186,
pg. 386.

- 23.- Killilea, S.D., Brandt, H., Lee, E.Y.C., and Whelan,
W.J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2363-2368.
- 24.- Martenson, T.M., Brotherton, J.E. y Graves, D.J. --
(1973) J.Biol. Chem. 248, 8329-8333.
- 25.- Martenson, T.M., Brotherton, J.E., y Graves, D.J. --
(1973), J. Biol. Chem. 248, 8333-8336.
- 26.- Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Griffiths, J.R., Radda,
G.K., y Richards, R.E. (1976) Eur. J.Biochem. 63, -
23-31.
- 27.- Wanson, J.C. y Drochmans, P. (1972) J.Cell. Biol.-
38, 130-150.
- 28.- Wanson J.C. y Drochmans P. (1972) J. Cell Biol. 54,
206-224.
- 29.- Takagi, A., Schotland, D.L., Dimauro, S. y Rowland,
L.P. (1973) Neurobiology 23, 1008-1016.
- 30.- Heilmeyer, L.M.G., Meyer F., Haschke, R.H. y Fis-
cher, E.H. (1970) J.Biol. Chem. 245, 6649-6656.
- 31.- Haschke, R.H. Heilmeyer, L.M.G., Meyer, F.y Fis-
cher, E.H. (1970) J.Biol. Chem. 245, 6657-6663.
- 32.- Haschke, R.H., Gratz, K.W. y Heilmeyer, L.M.G.-
(1972) J.Biol. Chem. 247, 5351-5356.
- 33.- Fischer, E.H., Heilmeyer, L.M.G. y Haschke R.H.
(1971). En "Current Topics in Cellular Regula-
tion" (Horecker, B.L. y Stadtman E.R., eds.) 4,
211-249. Academic Press, New York.

- 34.- Heilmeyer, L.M.G. y Haschke, R.H. (1972). En "Protein-Protein Interaction" (Jaenicke, R. y Helmreich, E. eds.) pags. 299-315. Springer-Verlag. Berlin.
- 35.- Busby, S.J.W., Griffiths, J.R. y Radda, G.K. (1974) Febs Letters, 42, 296-300.
- 36.- Morgan, H.E. y Parmeggiani, A. (1962), Biochem. -- Biophys. Res. Comm. 9, 252-256.
- 37.- Lyon, J.B. y Porter, J. (1963) J. Biol. Chem. 238, - 1-11.
- 38.- Morgan, H.E. y Parmeggiani, A. (1964), J. Biol. Chem. 239, 2440-2445.
- 39.- Atkinson, D.E. (1968), Biochemistry, 7, 4030-4034.
- 40.- Green, A.A., Cori, G.T. y Cori C.F. (1942), J. Biol. Chem., 142, 447-448.
- 41.- Fischer E.H. y Krebs, E.G. (1958) J. Biol. Chem., 231, 65-71.
- 42.- Krebs, E.G., Love, D.S., Bratold, C.E., Trayser, K.A., Meyer, W. y Fischer, E.H. (1964) Biochemistry 3, 1022-1033.
- 43.- Buc. M.H., Ullmann, A., Goldberg, M. y Buc. H. -- (1971) Biochimie, 53, 283-289.
- 44.- Valentine, R.C., y Chignell, D.A. (1968), Nature, 218, 950-953.
- 45.- Johnson, L.N., Madsen, N.B., Mosely, J., y Wilson, K.S. (1974) J. Mol. Biol. 90, 703-717.
- 46.- Eagles, P.A.M., Igbal, M., Johnson, L.N., Mosely, J., Wilson, K.S. (1972), J. Mol. Biol. 71, 803-806.

- 47.- Fletterick, R.J., Sygusch, J., Murray, N., Madsen, N.B., y Johnson, L.N. (1976) J.Mol. Biol. 103,1-13
- 48.- Johnson, L.N., Madsen,N.B., Weber, I.T.,Wilson,K.S. y Yeates,D.G.R. En los "Abstracts" del décimo congreso de la Unión Internacional de Bioquímica, Hamburgo (1976) Referencia : 04-5-L-020, pg. 147.
- 49.- Fletterick, R.J., Sygush,J.,Semple,H. and Madsen,- N.B. (1976) J.Biol.Chem. 251, 6142-6146.
- 50.- Barlett, M.L.S. y Graves,D.J. (1970) Biochim. Biophys. Research Comm., 38, 255-260.
- 51.- Saary,V.L.,Fischer,E.H. y Teller,D.C. (1970) Biochemistry, 9, 3591-3598.
- 52.- Wolf,D.P.,Fischer,E.H. y Krebs, E.G. (1970) Biochemistry,9, 1923-1929.
- 53.- Titani,K.,Cohen,P., Walsh,K. y Neurath,M.(1975)Febs Letters, 55, 120-123.
- 54.- Titani,K.,Koide,A.,Ericson,L.H. En los "Abstracts" del décimo congreso de la Unión Internacional de Bioquímica. Hamburgo. (1976).Referencia: 04-7-349, pg.229.
- 55.- Huminski,P.M. Ho,H.C. y Wang,J.H.(1973) J.Biol. - Chem., 248, 4933-4940.
- 56.- Shatsky,M.A.,Ho,H.C. y Wang,J.H. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 303 , 298-307.
- 57.- Ho,H.C.,Wirch,E. y Wang, J.H. (1973) Biochim.Biophys. Acta, 317, 462-472.

- 58.- Morange, M. "To be published"
- 59.- Ullmann, A., Vagelos, P.J. y Monod, J. (1964), Biochem. Biophys. Research Comm. 17, 86-92.
- 60.- Soman, G. y Philip, G. (1974) Biochim Biophys. Acta, 358, 359-362.
- 61.- Chao, J. y Graves, D.J., (1970) Biochem. Biophys. Research. Comm., 40, 1398-1403.
- 62.- Avramovic, O., Breidenbach, W.C. y Madsen, N.B. (1974) Can. J. Biochem. 52, 146-148.
- 63.- Madsen, N.B. (1956) J. Biol. Chem. 223, 1075-1087.
- 64.- Battell, M.L., Smillie, L.B. y Madsen, N.B. (1968) Can., J. Biochem. 46, 609-615.
- 65.- Kleppe, K. y Damjanovich, S. (1969), Biochim. Biophys. Acta, 185, 88-102.
- 66.- Tesis, M.H. Buc. (1970).
- 67.- Soman, G. y Philip, G. (1973), Biochim. Biophys. - Acta, 321, 149-155.
- 68.- Cacade, M.G., Di Prisco, G. y Zito, R. (1976), Febs Letters 62, 338-341.
- 69.- Buc. H., Morange, M., Garcia Blanco, F. y Dauchin, A., "Proceedings of the 9th Febs Meeting", 32, 57-75. Budapest.
- 70.- Cohn, M. y Cori, G. (1948) J. Biol. Chem. 175, 89-93.
- 71.- Wolfrom, M., Smith, C. y Brown, A. (1943), J. Biol. Chem., 65, 255.
- 72.- Firsov, L.M. Bogadieva, T.I. y Bresler, S.E., (1974) Eur. J. Biochem., 42, 605-609.

- 73.- Koshland, D. (1953) Biol. Rev., 28, 416.
- 74.- Engers, H.D., Bridger, W.A. y Madsen, N.B. (1969)
J.Biol. Chem., 244, 5936-5942.
- 75.- Kosower, E. () Molecular Biochemistry 2.15B.
14. Mc. Grau-Hill. New York.
- 76.- Hedrick, J.L. y Fischer, E.H. (1965) Biochemistry
4, 1337-1343.
- 77.- Johnson, G.F., Tu, J.I., Barlett, M.L.S. y Graves,
D.J. (1970) J. Biol. Chem., 245, 5560-5568.
- 78.- Shalthiel, S., Cortijo, M. y Zaidenzaig, Y (1972)-
"Metabolic Interconversion of the Enzymes", pgs.
72-101. Springer-Verlag. Berlin
- 79.- Shalthiel, S. y Cortijo, M. (1970) Biochem. Bio-
phys. Research Comm., 41, 594-600.
- 80.- Cortijo, M., Steinberg, I.Z. y Shaltiel, S. --
(1971) J. Biol. Chem. 246, 933-938.
- 81.- Jones, D.C. y Cowgill, R.W. (1971) Biochemistry,
10, 4276-4282.
- 82.- Johnson, G.F. y Graves, D.J. (1966) Biochemistry,
5, 2096-
- 83.- Shalthiel, S., Hedrick, J.L. y Fischer, E.H. (1966)
Biochemistry, 5, 2108-2116.
- 84.- Madsen, N.B., Avramovic-Zukic, O., y Honikel, K.O.
(1973) Ann. New York. Acad.Sci, 210, 222-237.
- 85.- Tesis de Licenciatura de Carlos Gutierrez Merino
(1964).
- 86.- Helmreich, E. y Cori, C.F. (1964) Proc. Natl. Sci.

USA. 51, 131-138.

- 87.- Ellman, G.L. (1958) Arch. Biochem. Biophys 74, 443-450.
- 88.- Buc-Caron, M.H. y Buc, H. (1975) Eur. J. Biochem. - 52, 575-588.
- 89.- Colowich, S.P. y Womack, F.C. (1969) J.Biol.Chem. - 244, 774-777.
- 90.- Ridlington, J. y Butter, L.G. (1969) J. Biol.Chem. 244, 777-779.
- 91.- Wadso, I. (1968) Acta Chem. Scand. 22, 927-937.
- 92.- Monk, P., y Wadso, I. (1968) Acta Chem. Scand. 22, 1842-1852.
- 93.- Sturtevant, J.M., y Lyons, P.A. (1969) J.Chem. - Thermodyn. 1, 201-209.
- 94.- Buc H., (1967) Biochem. Biophys. Research Comm. - 28, 59-64.
- 95.- Anderson, R.A. y Graves, D.J. (1973) Biochemistry 12, 1895-1900.
- 96.- Anderson, R.A., Parrish, R.F. y Graves, D.J. (1973) Biochemistry, 12, 1901-1906.
- 97.- Bresler, S. y Firsov, L. (1971) Biopolymers, 10, - 1187-1205.
- 98.- Madsen, N.B., Avramovic-Zukic, O., Luc, P.F., Honikel, K.O. (1976) Molecular and Cellular Biochemistry, 11, 35-50.
- 99.- Buc-Caron, M.H., Faure, F., Ondin, L.C. ; Morange, M., Vanderbunder, B., y Buc, H. (1974) Biochimie 56,

477-489.

- 100.- Buc, H. Buc, M.H., García Blanco, F., Morange, M. Congreso sobre interconversión de enzimas metabólicas. Seattle, 1973
- 101.- Battell, M.L. Zarkadas, C.G. Smillie, L.B. y Madsen, N.B. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6202-6209.
- 102.- Buc, M.H. y Buc, H. "Symposium of Regulation of the - Enzyme Activity and Allosteric Interaction" July - 1967 - Oslo.
- 103.- Allewell, N.M., Friedland, J., y Niekamp, K.P. (1975) Biochemistry, 14, 224-230.
- 104.- Subramanian, S., Stiegel, D.C. y Fisher, H.F. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5885-5889.
- 105.- Griffiths, J.R., Dwek, R.A., y Radda, G.K. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 243-251.
- 106.- Tung, M.S. y Steiner, R.F. (1975) Biopolymers, 14, 1933-1949.
- 107.- Klotz, I.M. (1953). En "The Proteins" (Neurath, H. ed.) 18, pags. 727-806. Academic Press, New York.
- 108.- Bennick, A., Dwek, R.A., Griffiths, J.R., y Radda, G.K. (1973) Am. New York Acad. Sci. 222, 175-191.
- 109.- Privalov, P.L., Khechinashilli, N.N. y Atanasov, A. (1971) Biopolymers 10, 1865-1890.
- 110.- Bresler, S., Firsov, L., y Glasonov, E. (1966) Nature, 211, 1262-1263
- 111.- Brooks, D.J., Busby, S.J.W., y Radda, G.K. (1974) - Eur. J. Biochem. 30, 339-347.

- 112.- Mackle, H. (1963) Tetrahedron, 19, 1159-1170.
- 113.- Okazaki, T., Nakazawa, A., y Hayaishi, O. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5266-5271.
- 114.- Black, W.J. y Wang, J.H. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 212, 257-268.
- 115.- Mott, D.M. y Bieber, A. (1970) J. Biol. Chem. - 245, 4058-4066.
- 116.- Kastenschmidt, L.L. Kastenschmidt, J. y Helreich, E. (1968) Biochemistry 7, 3590-3607.
- 117.- Danchin, A. y Buc, H. (1972) Febs Letters, 22, 289-293.
- 118.- Danchin, A y Buc, H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3241-3247.
- 119.- Thornton, J.M., y Bayley, PM. (1975) Biochem. J. 149, 585-596.
- 120.- Lehninger, A.L. (1970) en "Biochemistry", pg.- 228. Worth Publishers Inc., New York.
- 121.- Pullman, B., y Pullman, A. (1963) Quantum Biochemistry, 253-256. Ed. John Wiley and Sons. Ltd., London.
- 122.- Moo Lee, Y. y Benisek, W.F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1553-1560.
- 123.- Bjurulf, C., Laynez, J., y Wadso, I (1970) Eur.- J. Biochem. 14, 47-52.
- 124.- Shimomura, S., y Fukui, T. (1976) Biochemistry, 5, 1-5.
- 125.- Zenin, S.V. (1974) Dokl. Akad. Nauk. SSSR 217, (3),